INSTITUUT VOOR PLANTENZIEKTENKUNDIG ONDERZOEK

WAGENINGEN, NEDERLAND

DIRECTEUR: Dr. J. G. TEN HOUTEN

MEDEDELING No 161

ONDERZOEKINGEN OVER DE BIOLOGISCHE OVERDRACHT VAN EEN NON-PERSISTENT VIRUS

(AN INVESTIGATION OF THE BIOLOGICAL TRANSMISSION OF A NON-PERSISTENT VIRUS)

DOOR

H. A. VAN HOOF

DISSERTATIE WAGENINGEN, 1958

NSP
RAM
MM

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
15 SEP 1958

INSTITUUT VOOR PLANTENZIEKTENKUNDIG ONDERZOEK (I.P.O.)

Office and main laboratory: Binnenhaven 4a, tel. 2151, 2152 en 3641 Wageningen, The Netherlands.

Staff:

Director:	Dr. J. G. TEN HOUTEN.
Head of the Entomological Dept.:	Dr. H. J. DE FLUITER, Wageningen.
Deputy head of the Mycological Dept.:	Ir. A. M. VAN DOORN, Wageningen.
Head of the Nematological Dept.:	Dr. Ir. J. W. SEINHORST, Wageningen.
Head of the Plant Disease Resistance Dept.:	Dr. J. C. s'JACOB, Wageningen.
Head of the Virological Dept.:	Dr. Ir. J. P. H. VAN DER WANT, Wageningen.
Head of the Dept. for economic use of pesticides and aireal spraying in agriculture	Drs. P. TERPSTRA, Wageningen.

Research workers at the Wageningen Laboratory:

Mrs Ir. M. POST-BAKKER, Phytopathologist
Ir. A. B. R. BEEMSTER, Virologist
Dr. Ir. L. BOS, Virologist
Ir. A. M. VAN DOORN, Phytopathologist
Dr. H. J. DE FLUITER, Entomologist
Dr. C. J. H. FRANSSEN, Entomologist
Dr. J. GROSJEAN, Phytopathologist
Ir. N. HUBBELING, Phytopathologist and plantbreeder
Dr. J. C. s'JACOB, Phytopathologist and plantbreeder
Miss Dr. C. H. KLINKENBERG, Nematologist
Ir. R. E. LABRUYÈRE, Phytopathologist
Drs. H. P. MAAS GEESTERANUS, Phytopathologist
Dr. J. C. MOOI, Phytopathologist
Ir. H. DEN OUDEN, Nematologist
Miss Dra. H. Pflaeltzer, Virologist
Miss Dra. F. QUAK, Virologist
Dr. Ir. J. W. SEINHORST, Nematologist
Ir. F. H. F. G. SPIERINGS, Plantphysiologist
Drs. P. Terpstra, Biologist
Dr. F. TJALLINGII, Phytopathologist
Dr. J. H. VENEKAMP, Biochemist
Dr. Ir. J. P. H. VAN DER WANT, Virologist
Drs. J. C. Zadoks, Phytopathologist

Research workers elsewhere:

Ir. H. A. VAN HOOF, Phytopathologist
Drs. L. E. VAN 'T SANT, Entomologist
} detached to „Proefstation voor de Groenteteelt in de volle grond", Alkmaar, tel. K 2200-4568.

Drs. D. J. DE JONG, Entomologist
Ir. G. S. ROOSJE, Phytopathologist
} detached to „Proefstation voor de Fruitteelt in de volle grond", Wilhelminadorp, Goes, tel. K 1100-2261

Ir. T. W. LEFERING, Phytopathologist/Virologist, detached to „Proeftuin Noord Limburg" Venlo, tel. K 4700-2503.

Drs. G. SCHOLTEN, Phytopathologist, detached to „Proefstation voor de bloemisterij in Nederland", Aalsmeer, tel. K 2977-688.

Ir. G. P. TERMOHLEN, Phytopathologist, detached to „Proeftuin voor de Groente- en Fruitteelt onder glas", Naaldwijk, tel. K 1740-4545.

Guest workers:

Dr. P. A. VAN DER LAAN, Entomologist, „Laboratorium voor toegepaste Entomologie der Gemeente Universiteit," Amsterdam, tel. K 2900-56282.

Dr. Ir. G. S. VAN MARLE, Entomologist, Diepenveenseweg 226, Deventer. tel. K 6700-3617.

Ir. G. W. ANKERSMIT, Entomologist, „Laboratorium voor Entomologie", Agricultural University, Wageningen, tel. K 8370-2438.

Dr. Ir. J. B. M. VAN DINTHER, Entomologist, „Laboratorium voor Entomologie", Agricultural University, Wageningen, tel. K 8370-2438.

Aphidological Adviser:

Mr. D. HILLE RIS LAMBERS, Entomologist, T.N.O., Bennekom, tel. K 8379-458.

ONDERZOEKINGEN OVER DE BIOLOGISCHE OVERDRACHT VAN EEN NON-PERSISTENT VIRUS

With a summary:

AN INVESTIGATION OF THE BIOLOGICAL TRANSMISSION OF A NON-PERSISTENT VIRUS

DOOR

DR. H. A. VAN HOOF

VAN PUTTEN & OORTMEIJER - ALKMAAR - 1958

INHOUD

		Blz.
I	INLEIDING	3
II	BOUW VAN DE STILETTEN VAN EEN BLADLUIS	6
III	DIRECTE PROEVEN OM DE WIJZE VAN VIRUS-OVERBRENGING VAST TE STELLEN	12
	1. Met behulp van uitgeprepareerde stiletten	12
	2. Door de stiletten van een levende bladluis met virus te besmetten	13
	3. Door virus in het lichaam van een bladluis te brengen	14
IV	DE PLAATS, WAAR EEN BLADLUIS IN DE PLANT STEEKT	15
	1. Inleiding en gebruikte methode	15
	2. De lichaamshouding van een bladluis tijdens het zuigen	16
	3. Het doorboren van celwanden en cellen	17
	4. De speekselschede	21
	5. De zuighandeling	22
	6. Kritiek op een proef, waarbij bladluizen door een membraan zuigen	23
V	WAAR NEEMT EEN BLADLUIS HET VIRUS UIT DE CEL OP?	24
	1. Overbrenging van virus door een bladluis, na steken in besmet sap via gezonde epidermis of na steken in een zieke epidermis	24
	2. De weg van de stiletten van een bladluis in de epidermis onder natuurlijke omstandigheden	26
	3. Concentratie van het virus in de epidermis en in het parenchym	27
	4. Herkomst van het door bladluizen overgebrachte non-persistente virus	28
	5. Overbrenging van het virus uit het parenchym	29
	6. Kan transport van virus door de epidermiscellen worden aangetoond?	30
VI	ANALYSE VAN DE VIRUSOVERDRACHT UIT EEN GEISOLEERDE EPIDERMIS	32
	1. Invloed van warmte- en koudebehandeling van het zieke blad op de virusoverbrenging uit dit blad	35
	2. Invloed van het doden van het viruszieke blad door middel van chemicaliën op de virusoverbrenging uit dit blad	39

Blz.

3. Invloed van het impregneren van zieke bladeren met water of plantesap op de virusoverbrenging 40
4. Invloed van het vochtgehalte van het blad op de virusoverbrenging 41
5. Invloed van hoge druk op de virusoverbrenging . . 44
6. Invloed van het mechanisch verwonden van zieke bladeren op de virusoverbrenging 49
7. Invloed van het daglicht op de virusoverbrenging . . 52
8. Invloed van plasmolyse en deplasmolyse op de virusoverbrenging 53
   A. Opname van virus door *Myzus persicae* uit geplasmolyseerde of gedeplasmolyseerde bladeren . . . 54
   B. Infectie door middel van *Myzus persicae* van geplasmolyseerde of gedeplasmolyseerde bladeren . . . 56
   C. Diepte van de wond, die door wrijven met carborundum ontstaat 57
   D. Sapinoculatie van geplasmolyseerde of gedeplasmolyseerde bladeren 58

VII RECAPITULATIE VAN DE VOORAFGAANDE PROEVEN 67

VIII INVLOED VAN STOFFEN OP DE OVERDRACHT VAN VIRUS UIT EEN GEISOLEERDE EPIDERMIS . 70

IX GEEFT HET EFFECT, DAT BESTRALING MET ULTRAVIOLET LICHT OP HET VIRUS HEEFT, EEN VERKLARING VOOR ONZE PROBLEMEN ? 73

X INVLOED VAN DE KLEUR VAN DE ONDERGROND OP HET ZUIGEN VAN DE BLADLUIS 83

XI SAMENVATTING EN CONCLUSIE 85

SUMMARY 87

LITERATUURLIJST 94

HOOFDSTUK I

INLEIDING

Wanneer wij nagaan, welke de overbrengers van plantevirussen zijn, dan valt op, dat de bladluizen hierbij een belangrijke rol spelen. Aan de manier, waarop de overbrenging door deze insekten geschiedt, is vooral de laatste twintig jaren veel studie gewijd. Tot een helder inzicht in dit probleem is men echter nog niet gekomen. Daarom hebben wij getracht verder in deze materie door te dringen. De literatuur over deze overbrengingsproeven is uitvoerig besproken en samengevat (DAY & IRZYKIEWICZ 1955, SYLVESTER 1954, HEINZE 1957). Het heeft geen zin dit te herhalen. Wel willen wij hier de conclusies aanhalen, waartoe enkele onderzoekers gekomen zijn naar aanleiding van hun proeven en na bestudering van de literatuur over het mechanisme van de overbrenging van virussen door de bladluis.

Virussen zijn naar gelang van hun gedrag bij de overbrenging door bladluizen door WATSON & ROBERTS (1940) in twee groepen verdeeld nl. de non-persistente en de persistente virussen. Bij de non-persistente virussen is een bladluis slechts gedurende betrekkelijk korte tijd, nadat ze op een zieke plant gezogen heeft, in staat het virus over te brengen op een gezonde toetsplant. De bladluis brengt het virus beter over, indien ze gevast heeft, voordat ze op de virusbron geplaatst wordt. Een korte zuigtijd op de ziektebron geeft meer kans op virusoverdracht dan een lange zuigtijd. Bij de persistente virussen reageert een bladluis niet op een hongerperiode voor ze op de zieke plant wordt geplaatst; overbrenging slaagt beter of uitsluitend na een langere zuigtijd op de zieke plant. Het vermogen tot virusoverdracht behoudt een bladluis gedurende langere tijd. Nadat een bladluis op de virusbron gezogen heeft, moet een incubatietijd verlopen, alvorens het virus kan worden overgebracht.
Het is het meest waarschijnlijk, dat de persistente virussen door een bladluis op dezelfde manier worden overgebracht als dit bij de cicaden geschiedt, nl. doordat het virus met het plantesap opgezogen wordt. Nadat het virus door de darmwand is gediffundeerd, wordt het opgenomen in de bloedbaan en bereikt zo de speekselklieren. Via het speeksel wordt een gezonde plant geïnfecteerd.

Bij de non-persistente virussen geschiedt de overbrenging niet op deze manier.

SYLVESTER (1954) komt tot de conclusie, dat de overdracht van de non-persistente virussen geschiedt langs mechanische weg. De specificiteit en de efficiency, waarmede dit door een bladluis geschiedt, is volgens hem afhankelijk van de wisselwerking, die optreedt tussen de virussen, het speeksel van een bladluis en de cellen van de waardplant, die geïnoculeerd worden.

VAN DER WANT (1954) neemt aan, dat de non-persistente virussen aan de buitenkant van de stiletten worden geadsorbeerd en alleen door elutie kunnen worden vrijgemaakt. In het verschil, dat hij aanneemt in de fijnere structuur van de buitenkant van de stiletten bij de verschillende luizesoorten, meent hij het verschijnsel van de verschillen in efficiency ten opzichte van de virusoverdracht te kunnen verklaren. Deze adsorptie zou in de eerste seconden (of gedeelten daarvan) plaatsvinden, wanneer de stiletten in het weefsel van de zieke plant dringen en alleen dan, wanneer er geen of slechts zeer weinig speeksel wordt afgescheiden. Neemt de speekselafscheiding toe, dan zou geen virus meer kunnen worden opgenomen en ook niet wanneer de bladluis intercellulair zou zuigen. Het virus zou niet in het speekselkanaal kunnen doordringen en het virus, dat in het voedselkanaal komt, zou nooit meer in de plant terugkomen.

DAY & IRZYKIEWICZ (1955) nemen aan, dat de stiletten van de vector besmet worden tijdens het steken in het zieke planteweefsel, terwijl het door een bladluis opgenomen virus geen rol speelt bij de virusoverbrenging. Een gedeelte van het virus, dat zich op de stiletten bevindt, wordt geïnactiveerd door het speeksel, terwijl tussen de diverse virussen verschil bestaat in de mate, waarin deze inactivering plaatsvindt. Bovendien onderscheiden de verschillende bladluizen zich in hun produktievermogen van deze inactiverende stof. Een hongerperiode doet de activiteit van de inhibitor afnemen.

BRADLEY & GANONG lokaliseerden de plaats, waar het non-persistente virus zich in een bladluis bevindt door plaatselijke inactivering van het virus. Dit bereikten zij door bestraling van gedeelten van de stiletten met ultra-violet licht (1955a, 1957). Uit hun proeven bleek, dat alleen de top van de stiletten (de laatste 5 μ) dàt virus bevat, dat door een bladluis overgebracht wordt. Ditzelfde konden zij ook op een andere manier aantonen (1955b) en wel door de punt van de stiletten in een capillair met een formaldehyde-oplossing te steken. De virusoverbrenging van een infectieuze bladluis kon op deze manier geheel worden voorkomen. Indien echter het labium de stiletten omsloot, dan had een behandeling van het labium met een formaldehyde-oplossing meestal geen invloed op de virusoverdracht van de aldus behandelde bladluizen.

Het idee van WATSON & ROBERTS (1940), dat bij de non-persistente virussen een circulatie van het virus door het lichaam van de vector plaats zou vinden, is door hen verlaten. BAWDEN, HAMLYN & WATSON (1954) verklaren nu de betere overdracht van het virus door een bladluis na vasten door een grotere opname van sap uit de zieke epidermis. Bovendien zou in de epidermis een hogere virusconcentratie voorkomen dan in het dieper liggende weefsel.

De algemene opvatting is dus, dat bij non-persistente virussen mechanische overbrenging plaats vindt. Hierbij is dan niet uitgemaakt of het virus in of op de stiletten wordt overgebracht. De opvatting van HOGGAN (1933), dat de bladluis bij het terugtrekken van zijn stiletten uit de zieke waardplant een geringe hoeveelheid infectieus sap meeneemt en dit inbrengt in de gezonde toetsplant, is waarschijnlijk niet ver bezijden de waarheid.

Bradley (1953) toonde aan, dat een bladluis het non-persistente Y-virus alleen uit de epidermis opnam. Indien zij door de epidermis in het sponsparenchym steekt, vindt praktisch geen virusopname plaats. Dit bepaalde hij bij bladluizen, die tijdens hun voeding gestoord werden. Het labium sluit bij deze bladluizen niet direct om de stiletten. De lengte van het uitstekende gedeelte van de stiletten is hierdoor te meten. In 1956 vulde hij dit aan met waarnemingen bij bladluizen, die met CO_2 waren verdoofd. Hij stelde verder vast, dat een bladluis vrijwel niet meer in staat is virus uit een zieke plant op te nemen of aan een gezonde plant af te geven, indien de plant door een dun vliesje bedekt wordt. Kan een bladluis niet onmiddellijk in contact komen met de epidermis, dan wordt het gehele proces onmogelijk. Tegen de conclusie uit deze laatste proef hebben wij echter ernstige bezwaren, die wij later zullen bespreken (hoofdstuk IV, 6).

Er is maar heel weinig bekend over de bouw van de top van de stiletten van een bladluis, de plaats vanwaar het virus uit de plant wordt opgenomen en de factoren, die in de plant op het proces van virusopname invloed uitoefenen. Bovendien blijft er nog de kwestie van de mechanische virusoverbrenging, zoals dit in het laboratorium door de mens met behulp van carborundumpoeder gebeurt. Is deze principieel anders of berust deze mogelijk op hetzelfde mechanisme als de overbrenging, zoals deze door de bladluis geschiedt? In de volgende hoofdstukken willen wij op deze vraag dieper ingaan.

BOUW VAN DE STILETTEN VAN EEN BLADLUIS

Bij het uitprepareren van de stiletten uit bladluizen bleek, dat de waarnemingen van WEBER (1928) niet geheel juist zijn. Dit werd aanleiding om allereerst de bouw van de stiletten aan een nader onderzoek te onderwerpen.[1])

WEBER constateerde, dat bij *Aphis fabae* de steekborstels onmiddellijk uit elkaar wijken, indien ze uit het labium geprepareerd worden. Bij onze proefnemingen gebeurde dit inderdaad een enkele maal, doch het behoorde tot de uitzonderingsgevallen. Wel bogen de mandibulaire stiletten, vrijwel steeds terug van de stevig aan elkaar hechtende maxillaire stiletten, indien de uitgeprepareerde stilettenbundel in een vloeistof met een lage oppervlaktespanning werd gebracht.

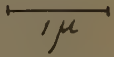
Omdat met de olie-immersie de fijnere structuren van de stiletten niet konden worden nagegaan, werden met de elektronenmicroscoop[2]) opnamen van de punten van de stiletten van *Myzus persicae* gemaakt.

De mandibulaire stiletten zijn volgens de foto's 1, 2 en 3 uitstekende boorwerktuigen; ze lopen uit in een uiterst fijne punt en zijn aan de buitenkant voorzien van chitinelijsten. Het geheel lijkt op een halve houtboor. Deze lijsten lopen echter niet steeds in dezelfde richting, maar hun richting verandert, zonder dat hierin enige regelmaat te onderkennen valt. De lijst wordt geleidelijk aan dunner in de richting van de punt van de stilet, maar het hoogteverval naar de andere kant is zeer plotseling (tekening 1). De buitenrand van de lijst is zeer scherp. De ruimte, die omsloten wordt door de rand van de lijst en het lichaam van de stilet is 150-200 mμ breed en enkele μ's lang. Op een afstand van 5 micron van de punt van de stilet lopen de chitinelijsten niet meer over de gehele breedte van de stilet. Ze worden steeds korter en minder geprononceerd en verdwijnen tenslotte geheel. Aan die kant, waar ze op grotere afstand van de punt nog aanwezig zijn, bevinden zich zeer dunne platen, die mogelijk voortzettingen zijn van de lijsten. Dit valt echter niet met zekerheid uit te maken.

In het centrum van ieder der mandibulaire stiletten loopt een kanaal, dat vlak bij de punt waarschijnlijk blind eindigt en dat soms ook vertakt is (foto's 2 en 3). Dit kanaal is niet over zijn gehele lengte open, maar vertoont onderbrekingen. Evenwijdig aan dit centrale kanaal, op ongeveer 2 μ afstand van de top, vertonen de foto's van de mandibulaire stilet twee lichtere banen. Volgens WEBER zouden op deze plaatsen inkervingen voorkomen. Het zo ontstane, ongelijke oppervlak van de mandibulaire stilet zou zich op deze wijze beter hechten aan het maxillenpaar. Duidelijke inkervingen werden echter niet waargenomen. De lichtere banen langs de

[1]) Naast *Stomaphis quercus* L. werden in dit onderzoek *Aphis fabae* Scop. en *Myzus persicae* Sulz. als proefdieren gebruikt. In de verdere tekst zijn de auteursnamen weggelaten.

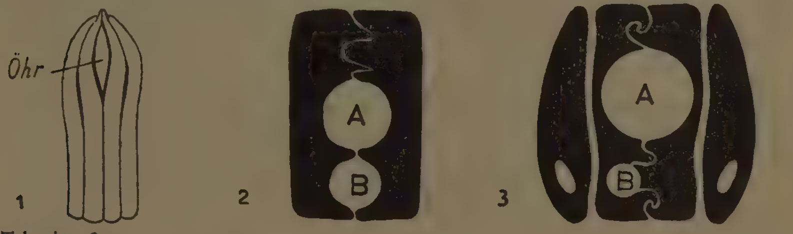
[2]) Mejuffrouw Dra. CHR. VAN DER SCHEER, verbonden aan de Landbouw Fysisch Technische Dienst te Wageningen, verrichtte met assistentie van de heer S. HENSTRA het elektronenmicroscopische onderzoek.



Tekening 1
Schematische overlangse doorsnede van een mandibulaire stilet.
Fig. 1
Schematic longitudinal section of a maxillary stylet.

kant van de mandibel zijn mogelijk te verklaren door een ombuiging van de zijkanten van de mandibel, waardoor de kanten bij bestraling minder doorlatend zijn. De mandibels liggen los tegen het maxillenpaar. Ze worden door het labium bijeen gehouden en, zoals verder zal blijken, hebben wij kunnen constateren, dat dit in de plant door de speekselschede gebeurt.

De maxillaire stiletten vertonen op de kant, waar ze niet door de mandibels worden omsloten — en ieder slechts aan één kant — eveneens chitineuze uitsteeksels (foto's 4, 5 en 6). Deze uitsteeksels gelijken waarschijnlijk zeer sterk op de doorsnede van de lijsten, die op de mandibels voorkomen. Behalve de eerste twee, liggen de lijsten echter bijna dubbel zo ver uit elkaar als op de mandibels. De beide maxillen glijden over elkaar door middel van lijsten en groeven, die in elkaar passen. De maxillen eindigen in een stevige spitse punt, gevormd door een verlenging van de binnenste chitinelijst, die gelegen is tegenover de kant, waarop de uitsteeksels voorkomen. De zeer dunne wand van het voedselkanaal eindigt ook geleidelijk bij deze punt, die bovendien aan de top iets uitgebogen is, zodat een soort lepelvormig geheel ontstaat. De beide uiteinden van de maxillaire stiletten liggen tijdens het zuigen niet tegen, doch naast elkaar, zodat van het „oog", dat volgens Weber (pag. 38) door de beide uiteinden gevormd zou worden en dat aan het eind gesloten en van zijdelingse openingen voorzien zou zijn, niets valt op te merken (foto 6 en tekening 2).



Tekening 2
1. Punt van de vier stiletten van *Aphis fabae* Scop. in zijaanzicht volgens Weber.
2. Dwarse doorsnede van de maxillaire stiletten van *Aphis fabae* Scop. volgens Weber.
3. Dwarse doorsnede van de maxillaire en mandibulaire stiletten van *Stomaphis quercus* L. In de tekening stelt B het speekselkanaal en A het voedselkanaal voor tussen de twee maxillaire stiletten.

Fig. 2
1. *Apex of the four stylets of Aphis fabae Scop. in lateral view according to* Weber.
2. *Transverse section of the maxillary stylets of Aphis fabae Scop. according to* Weber.
3. *Transverse section of the mandibulary and maxillary stylets of Stomaphis quercus L. In the figures, B is the salivary canal and A, the alimentary canal between the maxillary stylets.*

Het speekselkanaal eindigt 2 à 3 μ voor de punt van de stilet en heeft daar een diameter van 0,07 μ, terwijl het voedselkanaal een diameter van 0,35 μ heeft. Gemeten op de met het ultramicrotoom verkregen dwarse coupes verder van de punt van de stilet, zijn deze waarden resp. 0,20 en 0,50 μ (foto 8). De maxillen worden iets voorbij de plaats, waar het speekselkanaal eindigt, opmerkelijk smaller.

Daar het ons aanvankelijk niet mogelijk was om dwarse coupes van de stiletten te maken met een ultramicrotoom, hebben wij van een grote bladluis nl. *Stomaphis quercus* L. handcoupes van de stilettenbundel gemaakt (tekening 2). Hierbij valt op, dat het speekselkanaal niet door beide maxillen in gelijke mate wordt gevormd, maar dat één van de stiletten hiertoe vooral bijdraagt en dat het opvallend uit het midden ligt. Doordat de buitenste lijsten van de maxillenhelften in elkaar grijpen, wordt voorkomen, dat de maxillen uit elkaar wijken.

Dr. P. F. Elbers van het Zoölogisch Laboratorium van de Rijksuniversiteit te Utrecht is ons behulpzaam geweest met het maken van coupes met het ultramicrotoom van de stiletten van *Myzus persicae*. Nadat de bladluizen enkele uren in een OsO_4 oplossing gefixeerd waren, zijn ze in een bekerglas met water in een exsiccator geplaatst, waaruit de lucht met behulp van een waterstraalluchtpomp werd afgezogen. De stiletten werden daarna in blokjes agar evenwijdig aan elkaar ingesloten. Uit deze blokjes werd met behulp van een waterstraalluchtpomp de lucht verwijderd, waarna ze overgebracht werden in alcohol 70%. Hierna werden de agarblokjes met metacrylaat doordrenkt. Dit werd gepolymeriseerd, waarna met het ultramicrotoom coupes van 0,1 μ gemaakt werden (foto's 7 en 8). Het plastic monomeer blijkt echter niet of nauwelijks in de stiletten door te dringen, waardoor deze uiterst moeilijk zijn te snijden. De onregelmatige structuur is dus zeker niet reëel. Volgens Dr. Elbers zijn de stiletten waarschijnlijk zeer homogeen van structuur. De contouren echter zijn zeer zeker wel reëel. Dit blijkt ook uit de overeenkomst van de met de elektronenmicroscoop verkregen foto's van de stiletten van *Myzus persicae* en de tekening, die wij van coupes van stiletten van *Stomaphis quercus* maakten.

Onder de microscoop is te zien, dat de punten van de stiletten ten opzichte van elkaar bewegen. Omdat de mandibulaire stiletten los liggen van de twee maxillaire en ook van elkaar, veronderstellen wij, dat deze stiletten een op en neergaande beweging ten opzichte van elkaar maken. De maxillaire stiletten zijn weliswaar door groeven en richels met elkaar verbonden, maar dit sluit niet in, dat ze onbeweeglijk aan elkaar vastzitten (zie tabel 1).

Om na te gaan hoe ver de maxillenhelften over elkaar kunnen schuiven, hebben wij stilettenbundels uitgeprepareerd, de mandibulaire stiletten door dompelen in alcohol laten uitklappen en daarna het maxillenpaar afgesneden. De onderlinge afstand tussen de stilettepunten hebben wij met behulp van de olie-immersie bij 50 bladluizen gemeten. Wij komen dan tot de volgende waarden, die wij ter vereenvoudiging in groepen van 5 μ hebben ingedeeld.

TABEL 1. Onderlinge afstand tussen de punten van de maxillen bij 50 uitgeprepareerde maxillenparen van *Myzus persicae* en *Aphis fabae*.

TABLE 1. *Distance along the longitudinal axis between the tips of the maxillae in 50 pairs of maxillary stylets of Myzus persicae and Aphis fabae.*

Afstandsgroepen *Distance-groups*	*Myzus persicae*	*Aphis fabae*
0 — 5 μ	24	29
6 — 10 μ	10	11
11 — 15 μ	10	4
16 — 20 μ	1	6
21 — 25 μ	2	
41 μ	1	
63 μ	1	
76 μ	1	

De afstandsverschillen groter dan 20 μ, die wij bij *Myzus persicae* hebben waargenomen, zijn vrij zeker een gevolg van het uitprepareren. Het lijkt ons anderzijds niet waarschijnlijk, dat tijdens het steekproces bewegingen van meer dan enkele microns gemaakt zullen worden, dit in verband met het langzaam voortbewegen van de stiletten in het planteweefsel (zie volgend hoofdstuk).

In de maxillaire stiletten van een bladluis komen dus twee kanalen voor. Het ene, ventraal gelegen kanaal, vormt een gesloten verbinding met de speekselklier en dient voor aanvoer van speeksel. Dit laatste wordt via het kanaal in de plant geperst door een speekselpompje (zie WEBER), dat slechts in één richting werkt, zodat terugstromen onmogelijk is. Het andere sluit zonder lekken aan op de oesofagus. Uit waarnemingen van ZWEIGELT (1915), MITTLER (1953) en VAN SOEST & DE MEESTER-MANGER CATS (1956) blijkt, dat de plant door dit kanaal het voedsel in de bladluis perst. Een mechanisme om de voedselstroom in tegengestelde richting te doen verlopen ontbreekt.

Samenvattend kunnen wij de verschillen tussen de structuur van de stiletttten van bladluizen, zoals WEBER zich deze voorstelt en zoals wij die vonden, als volgt weergeven:

1. Bij een uit een bladluis geprepareerde stilettenbundel klappen de mandibulaire stiletten niet terug van de twee maxillaire stiletten (WEBER pag. 43). Dit gebeurt wel in een vloeistof met een lage oppervlaktespanning.
2. De fijne inkervingen (WEBER pag. 36), die aan beide zijden op de binnenkant langs de rand bij de punt van de mandibulaire stiletten zouden voorkomen en die zouden dienen om de wrijving tussen de maxillaire en mandibulaire stiletten te verhogen, werden niet opgemerkt. Mogelijk heeft WEBER zich vergist in de plaats van de chitinelijsten, die aan de buitenkant van de stiletten aanwezig zijn.
3. Het centrale kanaal van de mandibulaire stiletten is vaak aan het uiteinde onderbroken, dikwijls vertakt en zeer variabel van vorm.

4. Op de buitenzijde van de mandibulaire stiletten bevinden zich aan de punt chitinelijsten, die een typisch verloop vertonen. Op ± 5 μ van de punt worden ze aan één kant korter om tenslotte op ± 10 μ van de top geheel te verdwijnen.
5. Op de rechter zijkant van de mandibulaire stilet, dat is op de kant, waar de chitinerichels beginnen, bevinden zich een of meer dunne chitineplaten, die op een afstand van ± 5,5 μ en een tweede keer op een afstand van ± 7,5 μ van de top verwijderd een overslag vertonen met een andere plaat. Of deze platen een voortzetting zijn van de lijsten op de mandibel valt niet met zekerheid uit te maken.
6. De punt van de mandibulaire stilet is wel degelijk zeer spits en niet stomp, zoals WEBER (pag. 35) in zijn tekening 2a weergeeft.
7. De punten van de twee maxillaire stiletten zijn iets getordeerd, zodat ze geen gesloten oog kunnen vormen (WEBER pag. 38).
8. Chitinehaken komen aan de punt van de maxillaire stiletten voor op die plaats, waar de mandibulaire de maxillaire stiletten niet omgeven. Bovendien slechts aan één kant van de maxillaire stilet en wel aan de zijde tegenovergesteld aan die, waarvan een chitinelijst de lepelvormige punt vormt.
9. De dwarse doorsnede van de maxillaire stiletten beantwoordt in de volgende opzichten niet aan het schema, dat WEBER er van geeft:
   a. het voedselkanaal wordt door WEBER naar verhouding te klein weergegeven.
   b. het speekselkanaal wordt door WEBER naar verhouding te groot en te excentrisch weergegeven.
   c. beide maxillehelften grijpen op een veel gecompliceerder manier in elkaar dan WEBER dit voorstelt en wel door twee elkaar omgrijpende lijsten aan de beide kanten van de maxillaire stilettenbundel en bovendien door twee lijsten tussen het speeksel- en voedselkanaal.
   d. de contour van de maxillaire stiletten is dubbel spoelvormig en niet rechthoekig.

Het is niet waarschijnlijk, dat de gevonden verschillen uitsluitend werden veroorzaakt, doordat WEBER de doorsneden op een andere plaats zou hebben gemaakt.

Is er aan de hand van de bouw van de stiletten een idee over het mechanisme van de overbrenging van virussen te verkrijgen?
De volgende twee mogelijkheden lijken ons het meest waarschijnlijk:

a. Na een korte zuigtijd op de zieke plant zou een bladluis virus in zijn voedselkanaal kunnen krijgen, doordat tijdens het terugtrekken van de stiletten — wanneer geen speekselafscheiding meer plaats vindt — via de aangeboorde plasmodesmen, met virus besmette vloeistof in het voedselkanaal geperst wordt. Doordat beide maxillehelften een gedeelte van zowel het voedselkanaal als van het speekselkanaal vormen, is het gevolg van hun onderlinge beweging, dat het speekselkanaal niet

steeds tot op dezelfde plaats gesloten is. Wanneer dus na het terugtrekken van de stiletten uit een zieke plant een gezonde plant wordt aangeboord, kan het speeksel gedeeltelijk door het voedselkanaal stromen en eventueel virusdeeltjes die zich hierin bevinden, in de plant brengen.

b. De holten, die achter de chitinelijsten van de mandibulaire stiletten liggen, zouden een zeer geschikte ruimte vormen om materiaal mechanisch te vervoeren. Dit materiaal kan bestaan uit plantesap en fijn geraspt planteweefsel, waarin het virus zich bevindt, eventueel vermengd met speeksel.

Enige grond voor de laatste gedachtengang vormt een experiment van BRADLEY (1956). Deze auteur heeft kunnen waarnemen, dat met virus geïnfecteerde exemplaren van *Myzus persicae* het vermogen tot virusoverdracht verliezen, nadat zij met de stiletten in paraffine (smeltpunt 43-45° C) hebben gestoken. Men zou dit op tweeërlei wijze kunnen verklaren. Enerzijds meent BRADLEY, dat een aldus behandelde bladluis het virus niet meer uit de plant zal kunnen opnemen. Het lijkt ons waarschijnlijk, dat door paraffine de lijsten op de uiteinden van de stiletten zullen worden dicht gesmeerd, zodat van virusoverdracht ook geen sprake meer kan zijn. Anderzijds zou de paraffine het virus kunnen inactiveren. Dit lijkt ons onwaarschijnlijk.

Hoe moet in verband met deze gedachtengang het effect van de hongerperiode verklaard worden? Dat de samenstelling van het speeksel van een bladluis na een hongerperiode dezelfde zou zijn als na ononderbroken zuigen, is zeer onwaarschijnlijk. Wij veronderstellen, dat in het speeksel van een bladluis, nadat zij enige tijd zuigt, stoffen worden afgescheiden, die op het virus inactiverend werken. Voor een staving van dit idee maken wij weer gebruik van gegevens van BRADLEY (1956). Nadat zijn proefdieren een hongerperiode hadden doorgemaakt, plaatste hij ze op tabaksplanten, die besmet waren met aardappel Y-virus. Hierop liet hij ze tot 1 min., 1-10 min. of 11-20 min. zuigen. Bij ieder van deze tijden bepaalde hij hoe diep ze in het planteweefsel hadden gestoken.

Overbrenging werd praktisch alleen geconstateerd, indien de bladluizen niet dieper hadden gestoken dan 21 μ. Deze afstand stemt overeen met de dikte van de epidermis. Het percentage overbrenging daalde echter snel naarmate de zuigtijd toenam. Van de bladluizen, die tot 1 min. op de zieke plant zogen, brachten 49% het virus over, voor de bladluizen, die 1-10 min. op de zieke plant zogen 23% en voor de zuigtijd van 11-20 min. was dit percentage zelfs gedaald tot 12. Voor dit verschijnsel heeft BRADLEY geen verklaring gegeven. Naar onze mening rechtvaardigen de resultaten van deze proeven de conclusie, dat er een remstof in het speeksel gevormd wordt. De afscheiding van deze stof neemt toe naarmate het steekproces van de bladluis langer duurt.

Op de beide hier gelanceerde mogelijkheden van virusoverbrenging, dus in de stiletten en wel in het voedselkanaal, of wel buiten de stiletten en dan acher de chitinerichels van de stiletten, komen wij later terug.

DIRECTE PROEVEN OM DE WIJZE VAN VIRUSOVERBRENGING VAST TE STELLEN

Van der Want (1954) komt in zijn proefschrift tot de conclusie, dat het virus mogelijk aan de buitenkant van de stiletten geadsorbeerd wordt. Wanneer een besmette luis vervolgens in een gezonde plant steekt, wordt virus geëlueerd en vindt besmetting plaats. Naar aanleiding van deze opvatting hebben wij op drie manieren geprobeerd dit rechtstreeks aan te tonen.

1. MET BEHULP VAN UITGEPREPAREERDE STILETTEN

Hiervoor hebben wij stiletten van *Myzus persicae* uitgeprepareerd en op een stalen minutienaald van 12 mm lengte en 0,15 mm dikte geplakt. Onder een binoculair werd de stilettenbundel (bestaande uit de maxillaire en mandibulaire stiletten) gedurende 15 sec. in een druppel sap van een boon, besmet met *Phaseolus virus* 1, gestoken, waarna de stilettenbundel gedurende eenzelfde tijd in een druppel gezond bonesap werd gehouden. Deze handeling werd 10 maal herhaald, waarna met elke druppel een gezonde boneplant geïnoculeerd werd. In totaal werden 8 planten geïnoculeerd. Alleen de vier planten, die met sap van een zieke boon waren ingewreven, gaven ziektesymptomen. Met een glashaar werd eenzelfde proef uitgevoerd. De glashaar werd zo fijn uitgetrokken, dat de diameter overeenkwam met die van de stilettenbundel. Het idee was, dat er aan de stiletten wel en aan een glashaar geen adsorptie zou optreden. Ook hier werden alleen de controleplanten ziek, die met behulp van carborundum met sap, afkomstig van de zieke boneplant, geïnoculeerd werden. Met *aspermy* virus van tomaat, stoppelknolvirus en tabaksmozaïekvirus werd deze proef herhaald. Infectie werd alleen verkregen bij gebruik van een glashaar bij tabaksmozaïekvirus en wel bij 3 van de 4 planten (tabel 2). In dit laatste geval had dus mechanisch sapoverdracht plaatsgevonden.

Tabel 2. Aantal planten, dat ziektesymptomen vertoonde na inoculatie van 4 boneplanten resp. tabaksplanten met een druppel gezond sap, waarin 10 maal een stilettenbundel of een glashaar gedurende 15 sec. gedompeld was, nadat deze 15 sec. in een druppel bonesap resp. tabakssap gestoken was, besmet met het *Phaseolus virus* 1 of T.M.V.

Table 2. *Number out of 4 bean plants or tobacco plants respectively, which showed symptoms after being inoculated with a droplet of healthy sap, in which stylets or a glassfiber of the same diameter had been dipped 10 times during 15 sec.; after these stylets or glassfiber had been dipped during 15 sec. in a droplet of bean-sap, infected with Phaseolus virus 1 or tobacco sap, infected with T.M.V.*

	Glashaar *Glassfiber*	Stilet *Stylet*	Druppel ziek sap *Droplet diseased sap*
Phaseolus virus 1	0	0	4
T.M.V.	3	0	4

Het contact tussen stilettenbundel en virusbron verschilde bij deze proefopzet in de volgende opzichten van de situatie, zoals deze voorkomt, indien de bladluis zelf in het blad boort:

1. er is geen speekselschede aanwezig
2. er wordt niet intercellulair gestoken (zie IV, 3)
3. de snelle beweging, die de stilet in de plant maakt, wordt niet nagebootst

Daar men met uitgeprepareerde stiletten niet in een plant kan steken, hebben wij hiermede verder geen proeven uitgevoerd.

2. DOOR DE STILETTEN VAN EEN LEVENDE BLADLUIS MET VIRUS TE BESMETTEN

Indien men bij een levende bladluis de stiletten met virushoudend sap insmeert, dan is de bladluis wel in staat om de stiletten in de plant te brengen. Dit is te doen door bladluizen, die zuigen, van de plant te halen. Het duurt dan enige tijd, voordat de stilettenbundel in het labium teruggetrokken is. Men kan dan de top van de stiletten in ziek plantesap dompelen. Deze proef werd o.a. reeds door BRADLEY (1952) en DAY & IRZYKIEWICZ (1954) uitgevoerd, doch zij konden op deze manier geen virusoverdracht krijgen. Om de stiletten echter goed met ziek plantesap te kunnen bevochtigen, moet men de stiletten verder uit het labium halen. Dit kan men doen zonder de dieren te verwonden.

Een bladluis werd hiervoor onder een binoculair geplaatst, met een penseel op zijn rug gelegd en enige tijd in deze stand gehouden. Met een minutienaald werd over het labium gestreken en wel van de basis naar de top, waardoor het labium iets uitrekte. Het toplid van het labium klemt de top van de stiletten vrij stevig in een groef vast. Door het labium uit te rekken, verschuift de top van de stilettenbundel basaalwaarts in deze groef. Wordt het uitrekken gestaakt, waarna het labium weer in de lengte contraheert, dan wordt de top der stiletten naar het luizelichaam toegetrokken. De stiletten vormen tezamen een buigzame staaf en door de druk op beide einden van deze staaf springt de bundel basaalwaarts van het toplid van het labium uit de ter plaatse ondiepe labiale groef, terwijl de top van de stilettenbundel door het eindlid van het labium nog steeds wordt vastgehouden. Met de punt van een minutienaald werd nu de top van de stilettenbundel uit het labium gewipt. Het gelukt een bladluis meestal de stiletten weer geheel in de labiale groef terug te krijgen. Plaatst men nl. de zo behandelde bladluizen op een blad, dan is na verloop van tijd het merendeel weer aan het zuigen. Van een 10-tal bladluizen bleken er nl., 24 uur nadat de stiletten uit het rostrum gehaald werden, 7 weer aan het zuigen te zijn, 1 was verveld, 1 dood, terwijl 1 er niet in geslaagd was om de stiletten in het labium terug te krijgen. Door nu met grote aantallen te werken hoopten wij, dat het enkele bladluizen snel zou lukken de stiletten weer in het labium te brengen, voordat inactivering van het virus optrad. De stiletten van 280 *Myzus persicae* werden op deze manier ingesmeerd met ongecentrifugeerd sap van lupineplanten, die besmet waren met lupinemozaïekvirus. Van een 70-tal bladluizen werden de

stilettentoppen ingesmeerd met vloeistof, die eerst een bacteriefilter gepasseerd was. Tenslotte werden bij een 60-tal bladluizen de stiletten bevochtigd met de virushoudende vloeistof, verkregen van sap van met stoppelknolvirus besmette *Nicotiana glutinosa* planten, dat gedurende 60 min. bij 20.000 toeren was gecentrifugeerd. In geen van de gevallen werd echter overdracht van virus geconstateerd. Ook met Y-virus werd met deze methode geen overdracht verkregen. Mogelijk, dat een bladluis niet in staat is om, vóórdat inactivering optreedt, reeds de stiletten in het labium te brengen.

3. DOOR HET VIRUS IN HET LICHAAM VAN EEN BLADLUIS TE BRENGEN

Omdat met de vorige twee methoden niets bereikt werd, wilden wij proberen virusoverdracht te verkrijgen door virus in het lichaam van een bladluis te brengen en dit zowel bij non-persistente als bij persistente virussen, waarbij wij dan verwachtten, dat alleen in het laatste geval virusoverdracht zou plaatsvinden. BLACK (1940) toonde aan, dat niet besmette cicaden besmet konden worden door middel van injectie met een virusoplossing. Bij bladluizen is men er op deze manier echter nog zelden in geslaagd virusoverdracht te verkrijgen (HARRISON 1957). De sterfte onder de geïnjicieerde bladluizen is nl. zeer groot (HEINZE 1955). Door gebruik te maken van een zeer verfijnde methodiek slaagde STEGWEE (1957) er later in om door middel van injectie het bladrolvirus van aardappel in een niet besmette bladluis te brengen, zonder dat bij de behandelde luizen een grote sterfte optrad. Proeven met non-persistente virussen werden door hem niet verricht. Er werd daarom naar een andere methode uitgekeken. Wij merkten op, dat bij een bladluis, die b.v. een poot had verloren, de wond zich sloot en de bladluis verder leefde. Dit herstel van wonden bracht ons op het idee om kunstmatig een bladluis te verwonden en op de verse wond virushoudend sap te brengen in de hoop, dat tijdens het wondhelingsproces het virus binnen het insektelichaam zou worden ingesloten. Dit geschiedde op de volgende manier:
Een minutienaald, die in een lucifer als houder was bevestigd, werd in een oplossing van arabische gom gestoken. Met een kleine druppel gom werd een bladluis met de rug op de minutienaald vastgeplakt. Met de door VAN SOEST (1955) ontworpen schaar werd een antenne van een bladluis afgeknipt ter hoogte van het eerste lid. Een weinig fijngemaakt ziek planteweefsel werd op de wond geplaatst. Nadat het mengsel van lichaamsvocht en plantesap was opgedroogd, werd de bladluis met water losgeweekt. Tien behandelde bladluizen werden op één gezonde toetsplant geplaatst. De hele behandeling geschiedde onder een binoculaire microscoop. Veertig bladluizen werden op deze manier door ons in een uur behandeld. Dit heeft op de gezondheidstoestand van de bladluizen aanvankelijk geen nadelig effect, vgl. ook JOHNSON (1956). De latere sterfte onder de bladluizen varieerde van dag tot dag, maar meestal zogen 2-4 van de 10 bladluizen na 24 uur nog op de toetsplant. Met deze methode werd getracht bladrol van *Physalis floridana* door middel van

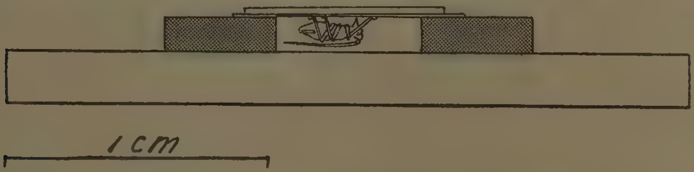
Myzus persicae over te brengen. Ook werd getracht met sap van het non-persistente lupinemozaïekvirus en aardappel Y-virus bladluizen op deze manier te besmetten. Hoewel wij met grote aantallen bladluizen werkten, verkregen wij langs deze weg nimmer een positief resultaat. Ook met tabaksmozaïekvirus werd een poging gewaagd, daar volgens SUKHOV (1944) het virus niet door de speekselschede zou kunnen dringen. Dit zou de oorzaak zijn, waardoor dit virus niet door bladluizen zou worden overgebracht. Is het virus echter eenmaal in een bladluis aanwezig, dan zou het met het nog niet gecoaguleerde speeksel wel in de plant gebracht kunnen worden. Virusoverdracht zou dus door injectie misschien wel mogelijk zijn. Ook met dit virus werd echter geen resultaat geboekt. Dat door toepassing van deze methodiek werkelijk virus in de bladluis terecht kan komen, staat dus allerminst vast.

HOOFDSTUK IV

DE PLAATS, WAAR EEN BLADLUIS IN DE PLANT STEEKT

1. INLEIDING EN GEBRUIKTE METHODE

Omdat met de besproken proeven via de meer directe methode, geen resultaten konden worden verkregen, werd op een andere manier te werk gegaan. Door een bladluis in een afgetrokken epidermis te laten steken, kan de beweging van de stiletten in het bladweefsel worden gevolgd. Hiertoe kan men met succes van blad van tulp of van hyacint gebruik maken, omdat men gemakkelijk grote stukken epidermis van deze bladeren kan aftrekken. In een celluloid plaatje ter dikte van 1,2 mm werd een gat geponst met een diameter van 5 mm (zie tekening 3). Met behulp van vaseline plakten wij over het gat een stukje epidermis met de cuticula op het celluloid plaatje. Op de andere kant van de epidermis werd daarna water, een fysiologische zoutoplossing (0,9% NaCl) of een suikeroplossing gebracht en het geheel afgedekt met een dun dekglaasje, dat aan de kanten



Tekening 3
Objectglas, waarop een kamertje, waarin een bladluis op een afgetrokken epidermis kan zuigen. Dit proces kan met de olie-immersie gevolgd worden.

Fig. 3
Microscope slide on which a "chamber" was placed where an aphid could feed on a stripped epidermis. The process of probing could be followed with the aid of an oil-immersion microcope.

ook was ingesmeerd met vaseline om het verdampen van de vloeistof op de epidermis zoveel mogelijk tegen te gaan. In het gat, dat in het celluloid was geponst, werd een bladluis op de epidermis geplaatst en het geheel werd hierna op een objectglaasje gezet. Indien de bladluis in de epidermis ging boren, kon met de olie-immersie het proces onder de microscoop gevolgd worden.

2. DE LICHAAMSHOUDING VAN EEN BLADLUIS TIJDENS HET ZUIGEN

Het valt op, dat, indien men een bladluis zo van ventraal bekijkt, het labium in de zuigstand bij *Aphis fabae* anders op het bladoppervlak geplaatst is dan bij *Myzus persicae*. Bij *Aphis fabae* staat het labium ongeveer ter hoogte van het middelste paar poten, bij *Myzus persicae* staat het labium veel verder naar voren. Wanneer men een bladluis van opzij met de loupe bekijkt dan brengt deze, wanneer zij gaat zuigen, het labium naar voren op het bladoppervlak. Hierdoor moet het lichaam opgericht worden tot de kop iets meer dan de stilettenlengte van het bladoppervlak verwijderd is. Naarmate de stiletten in de plant worden gedrukt, nadert de kop het bladoppervlak, terwijl het labium ingetrokken wordt tot tenslotte slechts het toplid buiten het bladluislichaam uitsteekt. Het moment, waarop de kop iets gezakt is, namen wij aan als begin van de boorhandeling.

Omdat dit vaak niet zo gemakkelijk valt te bepalen, heeft men als het begin van het boren aangenomen het ogenblik, waarop de antennes naar achteren over het lichaam zijn gebogen. Uit waarnemingen met microscoop en binoculair bleek echter, dat bij sommige bladluizen de antennes over het lichaam waren gelegd, terwijl het labium zich in rusthouding bevond. Ook komt het voor, dat zowel de antennes als het labium in boorhouding zijn en dat toch niet geboord wordt. Dit is te constateren aan het langzaam "slingeren" van het labium over de epidermis, zonder dat van een tasten gesproken kan worden. Soms kan deze beweging binnen het veld van de olie-immersie enige tijd worden waargenomen. Met een loupe zou het echter in zo'n geval uiterst moeilijk zijn om het al dan niet steken vast te stellen.

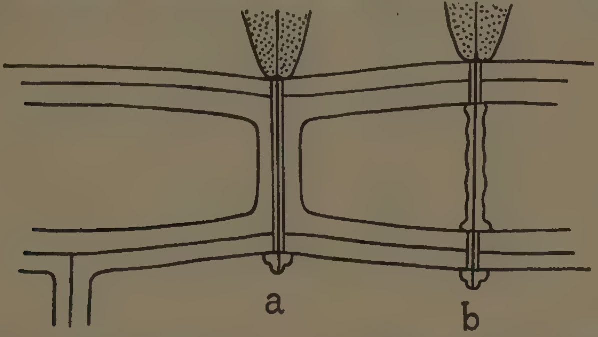
Gedurende het boren, ook bij korte boortijden, moet steeds een zekere kracht op de stiletten uitgeoefend worden. Ook bij het terugtrekken van de stiletten uit de plant moet kracht worden aangewend, dit gebeurt door een rukkende beweging en het loskomen geschiedt dan ook meestal vrij abrupt. Eveneens is bij het terugtrekken binnen de plant te zien, dat de stilettenbundel niet continu teruggetrokken wordt, maar dat de stiletten ook dan een op en neergaande beweging maken.

Tijdens het uit de plant trekken van de stiletten wordt, indien men niet ingrijpt, het labium weer uitgestulpt, zodat op het moment, dat het uiteinde van de stilettenbundel de plant verlaat de stiletten geheel of vrijwel geheel in de labiumgroeven zijn opgenomen. Alleen indien men een zuigende luis vrij snel van een plant optilt, kan het labium niet zo snel uitschuiven, zodat de topeinden van de stiletten buiten het labium uitsteken.

Aan het zuigen gaat soms een aftasten van de cuticula vooraf, door middel van het labium, doch het gebeurt ook, dat een bladluis plotseling stilstaat, het labium op het bladoppervlak plaatst en direct begint te boren.

3. HET DOORBOREN VAN CELWANDEN EN CELLEN

Wanneer een bladluis het labium op de cuticula plaatst om te zuigen, dan ontstaat op de cuticula een speekselafdruk van de top van het labium en de daarop gehechte tastborstels. De laatste zijn bij *Myzus persicae* veel langer dan bij *Aphis fabae*, waardoor ook een geheel andere afdruk gevormd wordt (foto 9 en 10). Bij het boren bestaat een voorkeur om op of bij de dwarse wanden te beginnen. De waarneming moest gedurende 10-15 sec. worden onderbroken om van de 400-voudige vergroting over te schakelen op de olie-immersie zonder het preparaat aan te raken. Vervolgens ziet men, dat de stiletten de celwand volgen. Het lijkt alsof ze langs de celwand gaan, maar in werkelijkheid boren ze in de dwarswanden. Dit blijkt ook het geval te zijn bij *Aphis fabae*, wanneer deze onder *natuurlijke* omstandigheden in de bladeren van tuinboon steekt (zie foto 18). De toppen van de stiletten ziet men onder de microscoop duidelijk in hun lengte-as heen en weer bewegen, hoewel men niet kan vaststellen hoe snel deze beweging is of welke van de vier stiletten precies bewegen. Wordt een dwarswand bereikt, die doorboord moet worden, dan bewegen de punten praktisch niet meer en het duurt enige tijd, voordat aan de andere zijde van de celwand de stiletten verschijnen (zie tabel 3, kolom 3 en a in tekening 4).



Tekening 4
Schematische voorstelling van het verloop van de speekselschede bij het doorboren van de celwand.
a. intercellulaire speekselschede
b. intracellulaire speekselschede

Fig. 4
Scheme of the course of the salivary sheath through the cell wall.
a. intercellular salivary sheath
b. intracellular salivary sheath

Het doorboren van een wand kost blijkbaar veel moeite, terwijl het boren in de wand zelf veel gemakkelijker gaat. Het beste kan men de tijd voor het dwars doorboren van een wand opnemen, indien een bladluis door het lumen van een cel zijn weg zoekt (zie b in tekening 4). In de cel wordt nl. door de stilettenbundel, die door de speekselschede omgeven is, een slingerende beweging gemaakt, die ophoudt, zodra de celwand bereikt wordt. De tijd, waarin de celwand wordt doorboord, is dus gelegen tussen het moment, waarop de slingerbeweging van de speekselschede ophoudt en het weer verschijnen van stiletten en speekselschede aan de andere zijde

van de wand. Dat dit doorboren een mechanisch proces is, wordt duidelijk gedemonstreerd door de op en neergaande beweging, die de celwand maakt tengevolge van de druk, die de stiletten erop uitoefenen.

In de volgende tabel vermelden wij enkele waarnemingen betreffende de tijd, waarin *Aphis fabae* en *Myzus persicae*, die tevoren wel of geen hongerperiode hadden doorgemaakt, de epidermis van hyacint doorboren.

TABEL 3. Tijden, waarin *Aphis fabae* en *Myzus persicae* de epidermis of een celwand van hyacint doorboren.

TABLE 3. *Time required by Aphis fabae and Myzus persicae for perforating the epidermis or a cell wall of hyacinth.*

Vasttijd in uren *Time of fasting, in hours*	Tijd, in sec., nodig voor: *Time, in sec., needed for:*		Plaats van boren *Place of perforating*
	Het doorboren van de epidermis *Perforating the epidermis*	Het dwarsdoorboren van de celwand *The transverse perforating of the cell wall*	
Aphis fabae			
0	138		? *)
0	200	40	?
0	75		A
0	80		A
0	82		A
0	130		A
0	150	25	B
0	155		A
6	180		?
6	212		?
6	218	96	B
4	130		?
6	85		A
1¾	175	40	A
2½	70		B
3½	89		B
Myzus persicae			
0	375	55	B
0	153		?
0	105		?
0	76		A
0	80		A
0	173		A
0	110	20	A
0	131	17	A
0	155		A
0	305		A
0	95		A
0	100		A
0	125		A
1	310		A
2	103		A
2¾	110		A
1½	174	40	B
2	80	13	A

*) ? = onbekend; *unknown*.
A = door de celwand; *through the cell wall.*
B = midden door de cel; *through the middle of the cell.*

Het doorboren van de epidermis duurde bij *Aphis fabae*, indien ze gevast had gemiddeld 126 sec., indien ze niet gevast had gemiddeld 145 sec. Bij *Myzus persicae* bedroegen deze tijden resp. 152 en 155 sec. Het al dan

TABEL 4. Tijd, waarin *Aphis fabae* en *Myzus persicae* de epidermis of een celwand van tuinboon doorboren.

TABLE 4. *Time required by Aphis fabae and Myzus persicae for perforating the epidermis or a cell wall of broadbean.*

Vasttijd in min. *Time of fasting, in min.*	Tijd, in sec., nodig voor: *Time, in sec., needed for:*		Plaats van boren *Place of perforating*
	Het doorboren van de epidermis *Perforating the epidermis*	Het dwarsdoorboren van de celwand *The transverse perforating of the cell wall*	
Aphis fabae			
0	126		? *)
0	332		B
0	126		A
0	187	32	A
0	174	28	A
0	158		A
0	103		A
0	124		A
0	160	96	B
15	150		A
10	115		A
20	177		A
24	108		A
60	117	44	B
75	58		B
Myzus persicae			
15	105		A
15	90		A
3	118		A
7	113		B
8	332	52	B
8	139		A
8	111		A
5	61		A
15	177		A
10	116		A
12	139		A
17	83		B
20	90	29	?
11	139		A
120	72		B
185	135		A
200	77		A
210	59		A
300	490		A
90	75		B
90	95	25	B
75	79		A
300	35		A
250	51		A

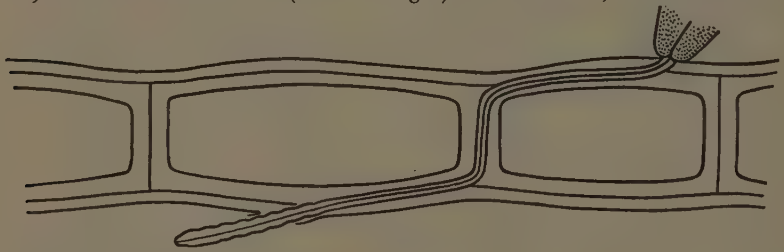
niet doormaken van een vasttijd door bladluizen voor zij gaan zuigen, heeft dus geen invloed op de snelheid van het doorboringsproces.

De tijden voor het doorboren van de celwand zijn relatief lang, bij *Myzus persicae* 40 en 55 sec. (zie b in tekening 4). Alleen indien de dwarswand van de cel gevolgd wordt en een bladluis met zijn stiletten tenslotte dus slechts de halve celwand te doorboren heeft (dus de verdikkingslagen aan één zijde) liggen de gevonden waarden bij *Myzus persicae* aanzienlijk lager nl. 20, 17 en 13 sec. (zie a in tekening 4).

Omdat de doorboringstijd bij tuinboon anders kan zijn dan bij hyacint, werden hierover ook waarnemingen verricht (zie pag. 19).

Hoewel de gevonden waarden (tabel 4) van dezelfde orde van grootte zijn als die, nodig voor het doorboren van de epidermis van hyacint (nl. voor *Aphis fabae* gemiddeld 165 en 121 sec. voor bladluizen, die respectievelijk al dan niet gevast hadden en voor *Myzus persicae* 124 sec.) valt het op, dat enkele malen de tijdsduur zeer kort was. Onze waarnemingen werden verricht in januari-maart 1955. In juni vonden wij, dat *Myzus persicae* de epidermis van jonge tuinboonplanten, besmet met lupinemozaïkvirus, in 40, 59, 35, 50, 33 en zelfs in 25 sec. kan doorboren. Het is mogelijk, dat de tijd, die nodig is voor het doorboren van de epidermis, mede beïnvloed wordt door de tijd van het jaar of dat de groeiomstandigheden van de toetsplant hierop van invloed zijn.

Het blijkt, dat het traject van de stiletten soms over vrij grote afstand de celwanden van vele achter elkaar liggende cellen volgt. Het ligt het meest voor de hand aan te nemen, dat in de celwanden steeds de middenlamellen gevolgd worden, daar deze een ononderbroken systeem in de plant vormen. Werd de middenlamel niet gevolgd, dan zou men in bepaalde gevallen — zoals in bijgaande figuur — een ander verloop van het stilettentraject kunnen verwachten (zie tekening 5). Zoals bekend, bestaat de mid-



Tekening 5
Het verloop van de speekselschede in de celwand. Tekening gemaakt aan de hand van foto's 12, 13 en 14.

Fig. 5
The course of the salivary sheath within the cell wall. Drawing made from photographs 12, 13 and 14.

denlamel voornamelijk uit pectine. Daarom is de door ADAMS & MCALLAN (1956) en MCALLAN & CAMERON (1956) aangetoonde aanwezigheid van pectinase — in vrij grote hoeveelheid — in het speeksel, zeer waarschijnlijk van groot belang bij het steekproces voor zover dit intercellulair verloopt.

Bij de door ons gebruikte bladluizen werd de epidermis voornamelijk via de dwarse celwanden doorboord, waarbij nooit werd waargenomen, dat gebruik werd gemaakt van de porus van een huidmondje, wel van de binnenwand van een sluitcel. Vele onderzoekers vermeldden reeds het intercellulair zuigen van een bladluis. Zweigelt (1915) constateerde, dat de stiletten van bladluizen, die de epidermis doorboren, zeer vaak door de dwarse celwanden gaan. Sukhov (1944) volgde bij *Myzus persicae* het verloop van het speekselkanaal. In vijf van de zes gevallen was het verloop intercellulair. Bij proeven van Bradley (1952), waarbij *Myzus persicae* een epidermis doorboorde, geschiedde dit echter in 12 van de 22 gevallen intracellulair, terwijl hiervoor ongeveer 1 min. nodig was. Skotland & Hagedorn (1955) menen zelfs met het feit, dat *Macrosiphum pisi* Kalt. (= *Acyrthosiphon pisum* Harris) voornamelijk intercellulair steekt, de slechte virusoverdracht door deze bladluis te kunnen verklaren.

4. DE SPEEKSELSCHEDE

De slingerbeweging, die de speekselschede maakt, wanneer zij gevormd wordt in een ruimte, waar haar beweging niet belemmerd wordt, kan alleen verklaard worden als gevolg van de beweging van de stiletten. Men kan zich voorstellen, dat de chitinelijsten van de mandibulaire stiletten bij het op en neer bewegen een weerstand in de speekselschede ondervinden, die resulteert in de slingerende beweging hiervan. Dat de maxillaire stiletten op deze beweging ook invloed uitoefenen, is niet zo waarschijnlijk, omdat ze grotendeels door de mandibulaire stiletten worden omgeven en omdat de beweging van de speekselschede in één vlak plaatsvindt. Zouden de vier stiletten alle in gelijke mate de beweging van de speekselschede beïnvloeden, dan zou men eerder een roterende beweging verwachten. De slingertijd van de speekselschede zou een aanduiding kunnen zijn voor het ritme, waarmede de mandibulaire stiletten op en neer worden bewogen. Allereerst valt op, dat de speekselschede niet voortdurend beweegt; na een aantal slingerbewegingen volgt een moment rust. Ook is de beweging de ene keer iets sneller dan op een ander moment. Het totaal aantal slingerbewegingen, dat in een bepaalde tijd bij drie luizen werd geteld, geven wij in de volgende tabel weer.

Tabel 5. Frequentie van de ritmische bewegingen van de speekselschede in water bij *Myzus persicae* tijdens het proces van speekselvorming.

Table 5. *Frequency of the swinging-movement of the salivary sheath of Myzus persicae in water.*

Aantal bewegingen *Number of oscillations*		Tijd *Time*	Frequentie *Osc. per sec.*
Luis 1	36	15 sec. rustperiode 2 sec.	1,2
	107	45 sec. „ 45 sec.	1,19
	39	17 sec. teruggetrokken	1,15
Luis 2	29	14 sec. „	1,04
Luis 3	99	47 sec. „	1,05
	52	29 sec. „	0,9
	82	42 sec. „	0,98

Een heen- of teruggaande beweging wordt dus in een halve sec. uitgevoerd, de gehele slingerbeweging dus in iets minder dan één sec., omdat de korte rustpozen tussen de boorperioden niet in rekening werden gebracht. De snelheid, waarmede de mandibulaire stiletten op en neer gaan, ligt waarschijnlijk ook in die orde van grootte.

Wij hebben nog getracht de lineaire snelheid van de beweging van de stiletten rechtstreeks vast te stellen en wel aan de hand van filmopnamen. De film moest hiervoor versneld worden opgenomen. De grote lichtsterkte, die hiervoor nodig was, hinderde de bladluizen echter zodanig, dat het niet mogelijk bleek hen gedurende een lange periode tot zuigen te brengen.

In de regel wordt een speekselschede gevormd, slechts één enkele keer ontbrak deze en weken de stiletten uiteen. Hieruit kan geconcludeerd worden, dat het niet gevormd worden van een speekselschede een zeer abnormaal verschijnsel is.

De speekselschede, die in de celwand ontstaat, ziet er heel anders uit, dan die welke in het cellumen of in de vloeistof boven een afgetrokken epidermis gevormd wordt (foto's 11 en 13). In de celwand is het een recht kanaal met evenwijdige wanden, in welks centrum de baan voor de stiletten ligt. Buiten de celwand is de wand van de speekselschede niet recht, doch gegolfd. Dit is zeer duidelijk op de foto waar te nemen. Dit gegolfde uiterlijk wordt veroorzaakt door de onregelmatige uitscheiding van speeksel. Dit wordt tijdens het voorwaarts gaan der stiletten in kleine porties, dus niet gelijkmatig geproduceerd, zodat in water of in het cellumen de speekselschede een kralensnoerachtig uiterlijk krijgt (foto's 15 en 16). Uit de foto's blijkt, dat de niet door de celwand geleide speekselschede recht is, behoudens vertakkingen. Kon de stilettenbundel gekromd worden door de bladluis zelf, dan zouden wij ook gebogen speekselscheden moeten waarnemen. Dit was evenwel niet het geval.

De wijze van ontstaan van een vertakte speekselschede (foto 16) eist een nadere omschrijving, daar dit op andere wijze geschiedt, dan men zou vermoeden. De rechte hoofdas bij een vertakte speekselschede is n.l. het laatst gevormd. Nadat een eenvoudige speekselschede gevormd is, doorboren de stiletten, na te zijn terugetrokken, de zijwand van de speekselschede somtijds en vormen op de zijwand een nieuwe speekselschede, waarbij het oorspronkelijke topgedeelte opzij wordt gedrukt. Dit proces kan een aantal malen herhaald worden. Het zijdelings doorboren van de speekselschede is een proces, dat opvallend veel tijd kost.

Ook de elektronenfoto, gemaakt van een stukje speekselschede, dat gedeeltelijk nog omgeven is door de omringende celwand, toont duidelijk een verschil in vorm tussen de speekselschede in de celwand en daarbuiten (foto 11).

5. DE ZUIGHANDELING

De volgende waarneming is nog het vermelden waard. Een *Myzus persicae,* die vier uur gevast had, had door een epidermis van een hyacint geboord, waarboven zich een suikeroplossing van 3% bevond. Hier stopte de verdere vorming van de speekselschede en was aan enkele deeltjes in de vloeistof, die waarschijnlijk door slijm aan de epidermis van de hyacint

waren vastgehecht, een pulserende beweging te zien. Met een stopwatch werden 438 pulsaties in 2 min. 21 sec. geteld. Daarna telden wij per 10 sec. resp. 36, 35, 33 en 32 pulsaties. Voor dit verschijnsel hebben wij geen aannemelijke verklaring kunnen vinden.

6. KRITIEK OP EEN PROEF, WAARBIJ BLADLUIZEN DOOR EEN MEMBRAAN ZUIGEN

In verband met de vermelde bevindingen lijkt het ons niet uitgesloten, dat het vinden van de zeefvaten door de passief geleid wordende stiletten een zuivere kanskwestie is. In dit verband dienen ook de proeven van BRADLEY (1956) te worden besproken. Deze onderzoeker liet bladluizen door een epidermis van tulp, ui, tabak of door parafilm (een synthetisch vliesje ter dikte van 10-20 μ) steken, dat op het vochtige blad van White Burley tabak gedrukt was. In het normale geval brachten onbehandelde bladluizen in de proeven van BRADLEY voor 60-80% het virus over. In bovengenoemde proef vond hij echter de volgende getallen: 0/75, 3/60, 8/40, 3/40, 2/20. Hierbij geeft de teller het aantal besmette planten weer van het totaal aantal in de proef gebruikte planten, dat in de noemer wordt vermeld.

Nu is White Burley tabak erg behaard, zodat er altijd een vrij grote ruimte overblijft tussen het vlies en de cuticula. Maar ook, indien deze ruimte gering zou zijn, is het allerminst voor de hand liggend, dat de stiletten van *Myzus persicae* ook werkelijk door het vlies in de epidermis van White Burley boren en er niet langs heen gaan. De speekselschede zou in dit laatste geval gevormd worden in de vloeistof of vochtige lucht tussen epidermis of vliesje en cuticula. BRADLEY constateert niet, dat inderdaad in de epidermis gestoken werd. Het lijkt ons, afgaande op onze eigen ervaringen, het meest waarschijnlijk, dat een bladluis slechts zelden in de epidermis van White Burley zal boren.

Wij hebben deze veronderstelling ook proefondervindelijk nagegaan. In de proefopzet, afgebeeld in tekening 3, werd in plaats van het dekglaasje een tweede afgetrokken epidermis gebruikt. Deze tweede epidermis lag met de cuticula-kant naar de eerste gekeerd. Wij lieten een aantal exemplaren van *Myzus persicae,* die tevoren gevast hadden, in deze tweede epidermis steken. Voor de overige waarnemingen werd slechts van die dieren gebruik gemaakt, die een voldoende lange speekselschede hadden gevormd om de epidermis van het zieke blad te kunnen doorboren. Opgemerkt moet worden, dat BRADLEY deze selectie niet op zijn proefdieren toepaste. Wij gebruikten in onze proef 21 bladluizen. Hiervan staken 7 in de tweede epidermis, terwijl 14 met hun speekselschede in de ruimte tussen beide epidermissen bleven. Slechts 33% van de bladluizen was dus eventueel in staat om het virus over te brengen. De door BRADLEY gevonden overbrenging is in het licht van onze proef dus niet zo abnormaal, vooral indien wij in aanmerking nemen, dat BRADLEY werkte met sterk behaarde White Burley bladeren, terwijl wij de epidermis van tuinboonplanten gebruikten. In dit laatste geval liggen de twee epidermissen betrekkelijk dicht op elkaar.

HOOFDSTUK V

WAAR NEEMT EEN BLADLUIS HET VIRUS UIT DE CEL OP?

Nu wij over de manier van boren van een bladluis iets beter zijn ingelicht, ligt de vraag voor de hand, of een bladluis uit de epidermis van zieke planten virus kan opnemen en zo ja, van welke plaats en onder welke voorwaarden.

Bradley (1952) heeft ook reeds gewerkt met de afgetrokken epidermis van tabak, besmet met een virus, dat bij *Datura stramonium* verwelkingsverschijnselen veroorzaakt *(Datura wilt virus)*. De stukjes epidermis trok hij van de middennerven van zieke tabaksbladeren of verkreeg hij door van een stuk blad de onderepidermis en het mesofyl van de bovenepidermis te schrapen. In vijf proeven kreeg hij geen overbrenging, bij drie latere proeven echter wel en dan alleen gedurende het eerste uur, nadat de epidermis van de middennerf getrokken was. Dertig bladluizen, die op de epidermis zogen, maakten 28 lokale vlekjes op een toetsplant, terwijl 20 controle-luizen, die op een intact ziek blad als infectiebron zogen, 25 vlekjes produceerden.

Wij wilden nu werken met de epidermis van gezonde planten resp. van planten, die besmet waren met een virus, dat gemakkelijk door bladluizen kan worden overgebracht. De tuinboon is waardplant voor een zodanig virus, terwijl van het blad bovendien de epidermis zeer gemakkelijk kan worden afgetrokken.

1. OVERBRENGING VAN VIRUS DOOR EEN BLADLUIS, NA STEKEN IN BESMET SAP VIA EEN GEZONDE EPIDERMIS, OF NA STEKEN IN EEN ZIEKE EPIDERMIS

a. Twee typen proeven werden genomen. Bij het ene lieten wij bladluizen zuigen op epidermis van tuinboon, besmet met *Phaseolus virus* 2 topnecrosestam (TN) (van der Want 1954). Daarna werden de bladluizen overgebracht op gezonde planten van het ras Beka om na te gaan of ze met virus besmet waren.

Bij het tweede type proeven lieten wij bladluizen steken door een epidermis van een gezonde plant op de keerzijde waarvan sap van een besmette boneplant was aangebracht. Ook hier werden de bladluizen, na te hebben gezogen, overgebracht op gezonde planten van het ras Beka. Vier en veertig

maal lieten wij een bladluis op de epidermis van een besmette boon zuigen, honderd twintig maal op die van een gezonde boon, waarop aan de keerzijde sap van een zieke boon was aangebracht. In geen van de 164 gevallen werden evenwel toetsplanten met virus besmet.

Bij een latere proefserie, waarbij onder een binoculair geconstateerd was, dat 9 bladluizen op een afgetrokken zieke epidermis gezogen hadden, brachten 2 bladluizen virus op een gezonde boon over.

b. Daar gebleken is, dat deze stam van *Phaseolus virus* 2 ook in normale overbrengingsproeven slecht door bladluizen overgebracht wordt, werd naar een ander virus gezocht, dat eveneens op tuinboon voorkomt en goed is over te brengen. Lupinemozaïekvirus (Mastenbroek 1942) wordt zeer goed door bladluizen overgebracht en is daarom meer geschikt voor onze proeven. Het gebruik van dit virus heeft het nadeel, dat de concentratie van het virus moeilijk te bepalen is, daar het mechanisch moeilijk kan worden overgebracht en geen waardplant bekend is, waarop lokale vlekken gevormd worden.

Met dit virus hebben wij de proeven herhaald, die wij met *Phaseolus virus* 2 stam TN reeds hadden uitgevoerd. Van 42 bladluizen *(Myzus persicae)*, die wij door een gezonde epidermis in ziek sap lieten steken, bracht één bladluis virus over op een gezonde plant. De betreffende bladluis had in 45 sec. de epidermis via de dwarse wand doorboord en had toen zijn stiletten weer teruggetrokken. Dit was de enige keer, dat in onze proeven een bladluis uit sap van een zieke plant virus overbracht. Uiteraard bestaat er geen zekerheid, dat het virus niet in de epidermis was doorgedrongen.

Op een afgetrokken epidermis van een met lupinemozaïekvirus besmette tuinboonplant plaatsten wij een 74-tal bladluizen, waarbij van iedere bladluis werd genoteerd, waar en hoe lang deze stak. Hiervan vormden 10 bladluizen hun speekselschede in het cellumen en 64 in de celwand. Wij hoopten op een goede overbrenging, omdat *Myzus persicae* uit intacte bladeren meestal in meer dan 50% der gevallen het virus overdraagt, indien met individuele bladluizen wordt gewerkt. Deze cijfers worden verkregen, indien een bladluis gedurende 15 sec. in de zieke plant steekt en dus niet dieper gestoken kan hebben dan de epidermis. Het resultaat van onze proef viel echter in zoverre tegen, dat met deze 74 bladluizen slechts in twee gevallen overdracht verkregen werd en wel beide keren na een tijd van 30 sec. In beide gevallen hadden de bladluizen in de celwand gestoken, zoals met de olie-immersie geconstateerd werd.

c. Omdat de conclusies, waartoe Bradley (1952) door zijn proeven komt, nl. dat de bladluis uit een afgetrokken epidermis het virus ook goed overbrengt, niet met onze resultaten overeenkomen, hebben wij nagegaan wat bij een ander virus gebeurde. Hiervoor namen wij bladeren van *Nicotiana glutinosa*, die 27 dagen tevoren besmet waren met stoppelknolvirus *(Cabbage blackring virus* of *Turnip virus* 1; Beemster, 1957). *Myzus persicae* kon 15 sec. op de onbeschadigde bladhelft of op de afgetrokken epidermis van de andere bladhelft zuigen. Hierna werden telkens 10 bladluizen 24 uur op een stukje blad van White Burley tabak geplaatst. Beide series werden driemaal herhaald.

TABEL 6. Aantal vlekken, veroorzaakt door 10 *Myzus persicae* op bladeren van White Burley tabak. Als virusbron diende een epidermis of het intacte blad van *Nicotiana glutinosa*, besmet met stoppelknolvirus, waarop *Myzus persicae* 15 sec. zoog, na een voorafgaande vasttijd.

TABLE 6. *Number of local lesions formed on leaves of White Burley tobacco by groups of 10 Myzus persicae, after an acquisition feeding period of 15 sec. on a leaf of Nicotiana glutinosa infected with cabbage blackring virus, or out of the stripped epidermis of this leaf.*

Na zuigen op: *Acquisition feeding on:*	Aantal lokale vlekjes op White Burley tabak *Number of local lesions on White Burley tobacco*		
	1e blad, *1st leaf*	2e blad, *2nd leaf*	3e blad, *3rd leaf*
Intact blad *Entire leaf*	4	12	16
Afgetrokken epidermis *Stripped epidermis*	2	0	0

Ook hier is het aantal overbrengingen zeer gereduceerd, wanneer een afgetrokken epidermis de intacte epidermis vervangt.

2. DE WEG VAN DE STILETTEN VAN EEN BLADLUIS IN DE EPIDERMIS ONDER NATUURLIJKE OMSTANDIGHEDEN

Wij vragen ons af, wat de oorzaak kan zijn van deze slechte overbrenging. Kan dit soms veroorzaakt worden, doordat een bladluis onder natuurlijke omstandigheden niet inter- maar intracellulair zuigt?
Om dit na te gaan handelden wij als volgt: Wij vonden, dat de speekselscheden in de afgetrokken epidermis achterblijven, indien van tuinboonbladeren, waarop veel bladluizen gezogen hebben, de epidermis afgetrokken wordt. Met katoenblauw en lactophenol werden de speekselscheden gekleurd. Deze methode is van zeer grote betekenis, indien men bijv. bij buiten groeiende planten zou willen vaststellen hoeveel proefboringen zijn verricht door een bladluis op zoek naar een geschikte waardplant.

Zowel bij *Aphis fabae* als bij *Myzus persicae* bleken de speekselscheden nagenoeg uitsluitend de dwarse celwanden van de epidermis te doorlopen. Ook viel op, dat buiten de epidermis, dus in het sponsparenchym, de speekselschede zich voornamelijk in de intercellulaire ruimte bevindt. Dit werd vastgesteld aan de pijpjes speekselschede, die als schoorsteentjes op de afgetrokken epidermis stonden (foto 17). In de vaatbundels echter, waar in de begeleidende cel van het zeefvat gezogen werd, komen geen intercellulaire ruimten voor en volgt de speekselschede weer de celwanden. Bij onze afgetrokken epidermis wordt de speekselschede dus op dezelfde plaats gevormd als op het blad van een intacte plant. De slechte virusoverbrenging uit de afgetrokken epidermis van een ziek blad wordt dus door deze waarneming niet verklaard. Dat in het sponsparenchym de speekselschede in de intercellulaire ruimte gevormd wordt, zou een verklaring geven voor het feit, dat na lange zuigtijden het percentage geslaagde overbrengingen daalt. In de intercellulaire holten is geen contact tussen

plant en stilettenbundel en men kan zich voorstellen, dat het opnemen van virus daardoor niet mogelijk is. Voor de bovenzijde van het blad, waar in het palissadeparenchym geen of kleine intercellulaire ruimten voorkomen, gaat deze redenering echter niet op. Bladluizen zuigen voornamelijk op de onderzijde van het blad.

3. CONCENTRATIE VAN HET VIRUS IN DE EPIDERMIS EN IN HET PARENCHYM

De vraag doet zich voor, in welke concentratie het virus in de epidermis en in het parenchym aanwezig is. Dit is te bepalen door van perssap zowel van de epidermis als van het parenchym verdunningen te maken en de besmettelijkheid hiervan te vergelijken. Om de concentratie van het virus in de epidermis en het onderliggende weefsel vast te stellen, hebben wij van het sap van de epidermis en van het onderliggende weefsel afzonderlijk verdunningsreeksen gemaakt en de infectiositeit hiervan onderzocht.

De werkwijze was als volgt: In twee weegflesjes werd 0,9 ml fosfaatbuffer van pH 7 gepipetteerd. Deze werden met afgetrokken stukjes epidermis van het blad van een tuinboonplant, die acht dagen van te voren met lupinemozaïekvirus besmet was, aangevuld tot 1 ml. In het tweede weegflesje werd tot 1 ml aangevuld met bladmoes, dat van het blad geschraapt werd op de plaats, waar de epidermis afgetrokken was. De verdere verdunningen werden met water gemaakt, nadat in een glasmortier het bladweefsel goed met de fosfaatbuffer vermengd was. Met iedere verdunning werden tien tuinboonplanten met behulp van carborundum geïnoculeerd.

TABEL 7. Aantal tuinboonplanten, dat ziek werd van een aantal van 10 na inoculatie met verdunningen, gemaakt van fijngewreven epidermis of van parenchym van bladeren van tuinboon, die met lupinemozaïekvirus besmet waren.

TABLE 7. *Number of broadbean plants of a total of 10 that became infected after inoculation with dilutions of minced epidermis or parenchyma of leaves of broadbean, infected with lupin mosaic virus.*

Verdunningen *Dilutions*	1/10	1/100	1/500	1/1000	1/2000
Epidermis	4	3	5	4	1
Parenchym	2	5	4	1	0

Het blijkbaar geringe verschil in concentratie tussen virus in epidermis en in parenchym behoeft evenwel niet te betekenen, dat bladluizen even gemakkelijk virus opnemen uit de epidermis als uit het parenchym. Zoals wij eerder zagen, verloopt het steektraject in de epidermis door de celwand, maar in parenchymatisch weefsel door de intercellulaire ruimte. Er bestaat dus een mogelijkheid, dat het verschil in contact tussen steekborstels (stiletten) en protoplast bij de doorboring van de epidermis resp. het

parenchym zou kunnen leiden tot verschillen voor wat betreft het gemak van virusopname uit deze beide weefsels. BAWDEN et al (1954) houden met dit feit in het geheel geen rekening, wanneer ze trachten een verklaring te geven voor de verschillen, die optreden, nadat een bladluis in de epidermis of in het sponsparenchym heeft gezogen. Een bladluis, die een vasttijd heeft doorgemaakt, alvorens op een zieke plant te worden geplaatst, brengt veel beter virus over na een korte zuigtijd, dan na een lange. De verklaring, die BAWDEN et al hiervoor nu geven, is, dat het sap, dat uit de epidermis opgenomen wordt, een veel hogere virusconcentratie bezit dan het sap, dat uit de dieper liggende cellagen wordt opgenomen. In dit laatste geval is volgens hen het eerst opgenomen virusrijke sap al in de maag beland en hier geïnactiveerd. Deze auteurs nemen nl. aan, dat alleen virus, dat nog in de stiletten aanwezig is, bij het proces van virusoverdracht een rol speelt. Een tweede veronderstelling, waarvan genoemde onderzoekers uitgaan en waarvan de juistheid nog aangetoond moet worden, is, dat een bladluis uit de epidermis of uit de eronder liggende cellagen werkelijk voedsel in zich opneemt. Hun verklaring berust voor een deel op het resultaat van proeven, waarbij zieke planten met ultraviolet licht werden bestraald. Op dit onderwerp komen wij in hoofdstuk IX uitvoeriger terug.

4. HERKOMST VAN HET DOOR BLADLUIZEN OVERGEBRACHTE NON-PERSISTENTE VIRUS

Zoals blijkt uit de in hoofdstuk IV beschreven proeven, gebruikt een stekende bladluis voor het doorboren van de epidermis een tijd van tenminste 25 seconden, terwijl voor het dwars doorboren van een celwand eveneens een tijd van 25 seconden nodig is (B in de tabellen 3 en 4). Wij kunnen ons voorstellen, dat het in sommige gevallen gelukt iets vlugger deze penetratie uit te voeren, maar de tijdsduur, die wij vonden, is voor wat de orde van grootte betreft zeker correct.

Bij proeven met het overbrengen van het non-persistente virus wordt algemeen het meeste succes verkregen, indien men een bladluis slechts zeer kort laat steken. In onze proeven lieten wij bladluizen steeds 15 seconden steken op intacte zieke bladeren en het percentage van overbrenging, dat hierbij verkregen werd, was juist bij deze korte tijd het hoogst. Op grond van onze metingen over de snelheid van het doorboren van celwand en epidermis moeten wij nu concluderen, dat bij een zuigtijd van 15 sec. een bladluis in geen geval dieper dan de epidermis geboord kan hebben en in vele gevallen wellicht niet verder is gekomen dan de buitenste celwand. Vindt men een hoog overbrengingspercentage bij zuigtijden van 15 sec. dan houdt dit dus in, dat de bladluizen het virus opnemen uit de epidermis, subsidiair uit de buitenste celwand hiervan. Bovendien blijkt uit onze doorboringsproeven van de epidermis, waarbij een bladluis nagenoeg steeds intercellulair — ofwel het inwendige van de celwand volgend — steekt, dat de virusopname uit de epidermis meestal of steeds plaatsvindt uit de celwand.

5. OVERBRENGING VAN HET VIRUS UIT HET PARENCHYM

Het lag voor de hand om, toen wij de overbrenging uit de afgetrokken epidermis hadden bepaald, na te gaan of de virusoverbrenging door een bladluis rechtstreeks uit het opengelegde sponsparenchym mogelijk is. Hiertoe werd van een blad van een tuinboonplant, dat symptomen vertoonde van infectie met lupinemozaïekvirus, de epidermis aan de onderzijde voor de helft verwijderd. Bladluizen konden zowel op de beschadigde als op de onbeschadigde bladhelft 15 sec. zuigen, waarna ze 24 uur op een gezonde tuinboonplant werden gezet.

TABEL 8. Overbrenging van het lupinemozaïekvirus door *Myzus persicae* op tuinboon na 15 sec. zuigen op intact ziek blad resp. ziek blad, waarvan de epidermis aan de onderzijde verwijderd was.

TABLE 8. *Transmission of lupin mosaic virus out of an infected leaf of broadbean by Myzus persicae. The lower epidermis of one leafhalf was removed, while the second half was the control. The acquisition feeding period of the fasted aphids was 15 sec. and the test feeding time 24 hours.*

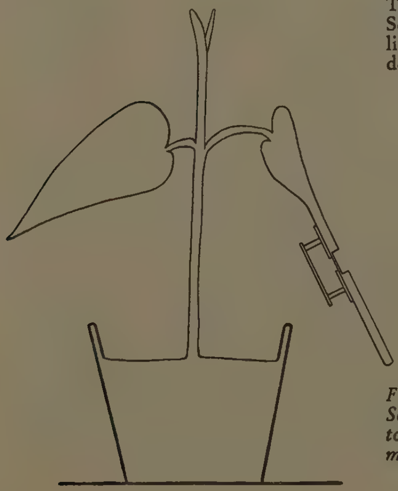
		Bladhelft zonder epidermis *Leaf half without epidermis*	Bladhelft met epidermis *Control*
Aantal ziekte planten van het totale aantal	serie I	3/10	8/10
Number of infected plants out of the total	serie II	5/17	16/17

Men mag hieruit niet zonder meer concluderen, dat het sponsparenchym minder virus zou bevatten dan de epidermis. Zoals hierboven opgemerkt, is het contact tussen speekselschede en cel in het sponsparenchym anders dan in de epidermis, maar bovendien kan hierbij dezelfde factor optreden, die bij het aftrekken van de epidermis in het spel is. Doordat de epidermis afgetrokken werd, kon een bladluis hieruit bijna geen virus meer overbrengen. Dit verschijnsel wordt wellicht door de verwonding veroorzaakt. Ook bij het blootleggen van het sponsparenchym kan men door soortgelijke oorzaken storingen in de virusopname verwachten. Het blijkt, dat uit een losgemaakte epidermis, ook al is de virusconcentratie hierin klaarblijkelijk niet minder hoog dan in het parenchym, minder gemakkelijk door een bladluis virus wordt opgenomen, dan uit het blootgelegde parenchym. Op zichzelf is blijkbaar virusopname uit het parenchym zeer wel mogelijk.

Na het beëindigen van deze proef ontvingen wij een publikatie van BRADLEY (1956), die een analoge proef uitvoerde. Hij heeft de bovenepidermis afgetrokken van een blad van White Burley tabak, besmet met het aardappel Y-virus. Vijftig *Myzus persicae* brachten uit een intact bladstuk 20 maal dit virus over, terwijl een gelijk aantal bladluizen uit parenchym — in zijn geval dus het palissade parenchym — 11 planten besmette en in een tweede proef slechts 7. BRADLEY's resultaten zijn geheel vergelijkbaar met de onze.

6. KAN TRANSPORT VAN VIRUS DOOR DE EPIDERMIS-CELLEN WORDEN AANGETOOND?

In de besproken proeven hebben wij aangetoond, dat virus door een bladluis uit de epidermis van een ziek blad wordt opgenomen. Vervolgens moest worden nagegaan of een bladluis, die virus opgenomen heeft uit een ziek blad, dit virus ook in een epidermis afgeeft en of via deze epidermis de plant wordt geïnfecteerd. Tevens wensten wij na te gaan of virus-transport over een afstand van meerdere cellen uitsluitend via de epidermiscellen plaats kan vinden. Bij bladeren van gezonde tuinboonplanten werd met een kurkboor de bovenepidermis en het parenchym doorboord. Het ponsstukje, dat een diameter had van $6^3/_4$ mm werd voorzichtig verwijderd en wel zo, dat alleen de onderepidermis onbeschadigd als een venstertje op het blad bleef zitten. Om uitdrogen van dit stukje epidermis te voorkomen werd het wondgat met vaseline gevuld. Op de cuticula-zijde van de epidermis werd weer met behulp van vaseline een stukje papier geplakt, waarin een gat van 4 mm diameter geponst was. Dit geschiedde zo, dat een rand van het epidermisvliesje ter dikte van ± 1 mm door het stukje papier bedekt was. Op het papier werd een glasring geplaatst, die weer met een dekglaasje was afgedekt. In deze ruimten werden vijf *Myzus persicae* geplaatst. Deze hadden enkele uren gevast en hadden daarna 10-15 min. gezogen op met lupinemozaïekvirus besmette tuinboonbladeren. Op iedere toetsplant was slechts één venstertje geponst (zie tekening 6). Van een totaal van 17 op de beschreven manier behandelde toetsplanten, waarbij dus 85 bladluizen gebruikt werden, werd slechts één plant ziek.



Tekening 6
Schematische weergave van de proefopstelling, waarbij getracht werd virustransport in de epidermis vast te stellen.

Fig. 6
Scheme of the experiment in which we tried to follow virus translocation in the epidermis.

Hieruit een conclusie te trekken omtrent de vraag of transport door de epidermis plaats vindt, lijkt ons niet gerechtvaardigd. Allereerst moet het niet uitgesloten worden geacht, dat er als gevolg van de ingewikkelde proefopstelling een fout is gemaakt b.v. door een verschuiving van het papier. Dit werd evenwel steeds gecontroleerd aan het einde van de zuigtijd en werd iets dergelijks waargenomen, dan werd deze plant verder uitgeschakeld. Bovendien kunnen bij deze proef dezelfde storende processen een rol spelen als bij de opname van virus uit een afgetrokken epidermis van een zieke plant. Verder kunnen de cellen van het epidermisvliesje zijn afgestorven, vóórdat het virus het intacte planteweefsel bereikt heeft. Enkele dagen nadat de proef was ingezet zagen de cellen aan de rand van het epidermisvliesje er wel vaak nog normaal uit, dit in tegenstelling met de cellen in het midden. Deze waren veelal donker gekleurd, terwijl bovendien vaak schimmelgroei werd waargenomen.

Het doel van verdere proeven was, te trachten, de oorzaak op te sporen van de slechte virusoverdracht van de bladluis uit de afgetrokken epidermis. Wij hoopten, dat wij hierdoor een beter inzicht konden krijgen in het hele mechanisme van de virusoverbrenging, vooral omdat aldus het probleem van een geheel andere kant werd aangepakt, dan in vroeger onderzoek was geschied.

ANALYSE VAN DE VIRUSOVERDRACHT UIT EEN GEISOLEERDE EPIDERMIS

Nu door ons is vastgesteld, dat een bladluis bij preferentie in de celwand steekt — en wel in de middenlamel — en hieruit ook virus opneemt, is het van belang eerst de bouw van de celwand nader te bezien. De middenlamel bestaat uit de primaire celwand en de nog tijdens de celstrekking aangelegde primaire verdikkingslagen. Hiertegen worden door het protoplasma weer de secundaire verdikkingslagen afgezet. De primaire celwand bestaat uitsluitend uit pectinestoffen, terwijl in de verdikkingslagen de hoeveelheid cellulose allengs groter wordt. Niet de hele celwand wordt verdikt; op bepaalde plekken (stippels) blijft verdikking achterwege. Deze stippels komen vooral tussen de cellen onderling voor en dienen voor transport van stoffen van cel tot cel (Stomps 1943). Bovendien komen in de wanden dunne plasmaverbindingen voor tussen de protoplasten: de plasmodesmen.

Wij willen uitvoeriger ingaan op de gegevens omtrent de plasmodesmen, omdat uit deze laatste het virus door de bladluis zou kunnen worden opgenomen. In de plasmodesmen heerst dezelfde druk als in het wandstandig protoplasma. Vocht uit de celwand, inclusief plasmodesmen, zou — indien een bladluis in de celwand boort — tijdens het terugtrekken van de stiletten door de speekselschede in het voedselkanaal geperst kunnen worden. Het is nl. waarschijnlijk, dat een bladluis niet actief zuigt, maar passief volgepompt wordt met vloeistof, die onder druk staat (Kennedy & Mittler 1953). Zonder uitvoerig in te gaan op de problematiek van transport in kleine buizen, die hierbij een rol speelt, zouden wij willen veronderstellen, dat de osmotische druk in het cellumen eenzelfde rol zou kunnen spelen als de bloedingsdruk van het floëem in de proeven van Kennedy & Mittler. Het is door de aanwezigheid van plasmodesmen in de celwand mogelijk, dat een borende bladluis bij afwezigheid van direct contact met het cellumen protoplasma bestanddelen opneemt. Vooral in de membranen der stippels zijn de plasmodesmen talrijk. Bij indrogen of afsterven van het weefsel sterven de plasmodesmen in de celwanden volgens Straszburger-Koernicke (1923) af, terwijl bij kunstmatige plasmolyse de plasmodesmen meer of minder volledig uit de celwanden teruggetrokken worden. Sheffield (1936) brengt de plasmodesmen in verband met het virustransport van cel tot cel. Het ontbreken van virusinsluitsels *(x-bodies)* in de sluitcellen van de huidmondjes verklaart deze onderzoekster uit het feit, dat zij geen plasmodesmen tussen deze sluitcellen en de buurcellen vond. Haar waarneming van insluitsels in de sluitcellen bleek achteraf niet juist te zijn (Kassanis 1939). Omgekeerd wordt het bestaan van plasmodesmen aangenomen op grond van het feit, dat virustransport van cel tot cel plaats heeft (Meeuse 1941). Lambertz (1954) meent het bestaan van plasmodesmen in de buitenwand van de epidermis te hebben aangetoond. Het bezwaar van zijn methode is echter, dat alleen, indien met behulp van sublimaat gefixeerd werd, de plasmodesmen zicht-

baar te maken waren. Hij vond, dat de plasmodesmen zich bij plasmolyse grotendeels terugtrekken en dat na deplasmolyse het terugtrekken nog verder voortgaat, zodat dan geen plasmodesmen meer kunnen worden aangetoond. STRASZBURGER (1901) had dit reeds waargenomen bij plasmodesmen in de wanden tussen de cellen. Zijn verklaring hiervoor is, dat bij plasmolyse, wanneer het plasma van de celwand loslaat, ook de plasmodesmen worden meegetrokken.

LAMBERTZ meent, dat ook het afbreken van het contact protoplast—plasmodesmen oorzaak kan zijn, dat de plasmodesmen niet meer te kleuren zijn. Hij constateeerde bovendien een dagelijks ritme in het aantal plasmodesmen. 's Nachts zouden er veel meer zijn dan overdag, zo ook meer bij warm, zonnig weer, dan bij betrokken, koel weer. Door de plasmodesmen in de buitenwand van de epidermiscel, ook „ectodesmen" genaamd, kunnen stoffen van buiten de plant naar binnen worden getransporeerd. Dit toonden SCHUMACHER & LAMBERTZ (1956) voor aminozuren aan.

ROELOFSEN & HOUWINK (1951) vinden, dat de dwarse wand van een cel van een meeldraad van *Tradescantia virginica* op ongeveer 800 plaatsen door cirkelvormige gaten van ongeveer 0,1 μ in diameter is doorboord. Volgens deze onderzoekers zouden door deze ruimten waarschijnlijk de plasmodesmen gaan. Ook in de membranen van de stippels worden deze gaten gevonden. Deze auteurs kunnen bedoelde gaten echter niet op de buitenwand van de cel aantonen. Volgens Lambertz zouden de plasmodesmen niet eenvoudig uit gaten, dus rechte kanalen, bestaan, maar zij zouden een ingewikkelde vertakte structuur hebben. Omdat het niet zeker is, dat de plasmodesmen een continue verbinding vormen van protoplast tot protoplast en zo dit laatste wel het geval zou zijn, de virusdeeltjes, zoals ze met de elektronenmicroscoop worden waargenomen, te groot zijn om deze plasmadraden te passeren, veronderstelt ESAU (1956), dat een virus mogelijk niet als een compleet deeltje, maar in een kleinere vorm de celwand passeert. Dit over plasmodesmen, die dus gedacht worden in een overigens dode celwand.

Uit recente publikaties van sommige botanici blijkt hun opvatting, dat de celwand — althans in zekere groeistadia — wel degelijk een levend bestanddeel van de cel is en dus levend protoplasma bevat (FREY-WYSSLING 1950). Het is moeilijk te bewijzen, dat zich in de celwand buiten de ectoplast (het plasmalemma) plasmabestanddelen bevinden. CURRIER & VAN DER ZWEEP (1955) houden deze mogelijkheid nog open in hun studie met 2.3.5. - triphenyl - tetrazoliumchloride bij *Elodea*. Zij constateerden, dat na de reductie van dit kleurloze produkt in de plant tot een rode onoplosbare formazan, het eerst langs de celwanden kleuring optrad en daarna pas in het plasma. Na plasmolyse kleurt de celwand echter niet meer, ook na deplasmolyse komt de kleurbaarheid van de celwand niet terug. Vindt kleuring vóór de plasmolyse plaats, dan behoudt de wand de rode kleur, dus dan blijft na plasmolyse, òf een gedeelte van het plasma achter op de celwand, òf de celwand zelf bevat plasmabestanddelen.

Volgens de botanische literatuur zijn dus plasmabestanddelen in de celwand aanwezig, bestaande uit de plasmodesmen en niet nader gedefinieerde elementen. Een in de celwand borende bladluis is dus niet verstoken

van contact met plasma-elementen. Zelfs indien virus alleen in de protoplast zou voorkomen, sluit intercellulair boren contact met virus dus niet uit.

Dat virus in de celwand aanwezig is, maken proeven van BAWDEN & CROOK (1947) aannemelijk. Zij vonden namelijk evenveel virus in de celwanden als in het plantesap van zieke bladeren. Door fijnwrijven en uittrekken met water was dit virus niet vrij te maken, wel echter met behulp van een enzym verkregen uit slakkemagen. Om dit te verklaren, poneren zij twee mogelijkheden en wel:

1. Het virus in de celwanden zou naar verhouding minder infectieus zijn dan het virus in het plantesap (BAWDEN & PIRIE, 1945, 1946). Dit kan op een kwalitatief verschil berusten: het virus uit de celwand zou met een produkt van de waardplant een onoplosbare verbinding kunnen zijn aangegaan; deze verbinding zou dan onder invloed van het enzym weer worden verbroken.
2. Het virus zou in de celwanden opgesloten zijn. Het zou kunnen worden vrijgemaakt ten dele door fijnwrijven, maar beter nog met behulp van enzym uit slakkemagen.

Het blijft voorlopig raadselachtig, waarom een bladluis uit een losgeprepareerde epidermis niet even gemakkelijk virus opneemt als uit een intacte epidermis. Indien evenwel een bladluis virus uit plasmodesmen zou opnemen, kan men zich indenken, dat als gevolg van een wondreactie — zoals gevonden door LAMBERTZ bij plasmolyse — de plasmodesmen zich bij het aftrekken van de epidermis uit de celwand terugtrekken.

Ook zou men zich kunnen voorstellen, dat tengevolge van de wondreactie stoffen uit het protoplasma vrijkomen, die virus in de celwand inactiveren.

NICOLAI (1929) vond, dat de protoplasten een verhoogde permeabiliteit vertoonden als gevolg van een mechanische prikkeling. Het aftrekken van de epidermis is ongetwijfeld een sterke mechanische prikkel.

In de hierna te bespreken proeven hebben wij getracht een verklaring te vinden voor de geconstateerde slechte virusoverbrenging door een bladluis uit een afgetrokken epidermis van het blad van een zieke plant.

Bovendien hebben wij nagegaan hoe de overbrenging van virus uit een intact blad door een bladluis wordt beïnvloed door de virusbron, dus het zieke blad, aan verschillende behandelingen te onderwerpen. Veelal werd naast de overbrenging van het virus door bladluizen ook de mechanische overbrenging van het virus met behulp van carborundum nagegaan om een beter inzicht te krijgen in overeenkomst en verschil tussen beide processen. In de uitgevoerde proeven trachtten wij de volgende analyse te maken:

1. Invloed van een warmte- en koudebehandeling van het zieke blad op de virusoverbrenging uit dit blad
2. Invloed van het doden van het viruszieke blad door middel van chemicaliën op de virusoverbrenging uit dit blad
3. Invloed van het impregneren van zieke bladeren met water of plantesap op de virusoverbrenging

4. Invloed van het vochtgehalte van het blad op de virusoverbrenging
5. Invloed van een hoge druk op de virusoverbrenging
6. Invloed van het mechanisch verwonden van zieke bladeren op de virusoverbrenging
7. Invloed van het daglicht op de virusoverbrenging
8. Invloed van het plasmolyseren en deplasmolyseren op de virusoverbrenging
   A. Opname van virus door *Myzus persicae* uit geplasmolyseerde of gedeplasmolyseerde bladeren
   B. Infectie door middel van *Myzus persicae* van geplasmolyseerde of gedeplasmolyseerde bladeren
   C. Diepte van de wond, die door wrijven met carborundum ontstaat
   D. Sapinoculatie van geplasmolyseerde of gedeplasmolyseerde bladeren

1. INVLOED VAN WARMTE- EN KOUDEBEHANDELING VAN HET ZIEKE BLAD OP DE VIRUSOVERBRENGING UIT DIT BLAD

Door een verblijf bij temperaturen boven het maximum of beneden het minimum worden de cellen van het blad gedood, waardoor de turgor verdwijnt. Ook vinden, waarschijnlijk reeds tijdens het afsterven, allerlei omzettingen plaats. In verband met het onderhavige onderzoek was het van belang na te gaan, of de virusoverbrenging ook door een temperatuurbehandeling van de infectiebron beïnvloed wordt.

Voor onze proeven hebben wij bladeren van tuinboonplanten, die besmet waren met het lupinemozaïekvirus, òf gedurende 30 min. bij 52° C. verhit, òf in de diepvriescel bij -20° C. geplaatst. Een derde partij zieke bladeren bleef onbehandeld en diende ter controle. Bladluizen, die eerst een vasttijd hadden doorgemaakt, mochten 15 sec. zuigen op ieder object. Per object werden 12 bladluizen gebruikt, die ieder op een gezonde tuinboonplant werden geplaatst. Tevens werden 10 tuinboonplanten mechanisch geïnoculeerd met sap, dat geperst was uit de behandelde bladeren.

TABEL 9. Invloed van het bevriezen of verhitten van tuinboonbladeren, besmet met lupinemozaïekvirus, op de overbrenging van dit virus door *Myzus persicae* en op de mechanische overbrenging met carborundum.

TABLE 9. *Influence of freezing or heating of a leaf of broadbean, infected with lupin mosaic virus on the transmission of this virus by Myzus persicae or on mechanical transmission by carborundum.*

Behandeling *Treatment*	Overbrenging door een bladluis *Aphid transmission*	Mechanische overbrenging *Mechanical transmission*
Controle *Untreated*	9/12 [1])	3/10
30 min. 52° C.	0/12	3/10
Diepvries —20° C. *Deep-frozen —20° C.*	0/12	5/10

[1]) aantal geïnfecteerde planten/aantal proefplanten.
number of infected plants/number of test plants.

Uit de resultaten blijkt (tabel 9), dat het virus niet wordt geïnactiveerd, daar mechanische overbrenging mogelijk is, maar dat een bladluis het virus toch niet meer uit de plant kan opnemen. Om na te gaan bij welke grens overbrenging bemoeilijkt werd, werden bladeren van tuinboon, besmet met lupinemozaïekvirus, gedurende 5 min. in water van verschillende temperatuur gedompeld. Hierna werden 25 *Myzus persicae*, die 5 uur gevast hadden, gedurende 10 min. op de bladeren geplaatst, waarna bladluizen in vijf groepjes van vijf op gezonde tuinboonplanten werden gezet.

TABEL 10. Invloed van een temperatuurbehandeling van 5 min. op de overbrenging van het lupinemozaïekvirus door *Myzus persicae* uit een ziek tuinboonblad. Op 5 toetsplanten werden groepjes van 5 bladluizen geplaatst.

TABLE 10. *Influence of a 5 minutes dip of an infected leaf of broadbean in water of different temperatures on the transmission of lupin mosaic virus by Myzus persicae. Fasting time 5 hours, infection feeding time 10 min. Five aphids were placed on one test plant. Number of test plants per group 5.*

Temperatuur *Temperature*	Aantal geïnfecteerde tuinboonplanten *Number of infected broadbean plants*
40° C.	3
42° C.	5
44° C.	3
46° C.	1
48° C.	2
50° C.	1

Het blijkt (tabel 10), dat de overbrenging van het lupinemozaïekvirus uit bladeren verhit boven 44° C. afneemt, maar dat ook uit bladeren gedurende 5 min. verhit tot 50° C. nog overbrenging kan plaatsvinden.

Nadat de bladluizen van de zieke bladeren genomen waren, legden wij de bladeren op vochtig filtreerpapier in een petrischaal. Hoewel na de warmtebehandeling de bladeren er nog turgescent en levend uitzagen, bleek na enkele dagen, dat de bladeren, die een temperatuurbehandeling van 48° tot 50° C. hadden doorgemaakt, totaal tot rotting waren overgegaan. Dit was gedeeltelijk het geval bij bladeren, die gedurende 5 min. in water van 46° C. gedompeld waren. De andere temperaturen bleken goed doorstaan te worden. In het blad hebben tengevolge van de temperatuurbehandeling blijkbaar processen plaatsgevonden, die na enkele dagen de dood van het blad tengevolge hadden en tegelijkertijd het virus voor de bladluis minder opneembaar maakten (tabel 10).

Omdat met het lupinemozaïekvirus geen lokale vlekjes verkregen kunnen worden, hebben wij met het stoppelknolvirus, waarmee dit wel kan, de proef herhaald. Wij wilden tevens nagaan of bij een ander virus de overbrenging door *Myzus persicae* door een warmtebehandeling van de waardplant op dezelfde wijze wordt beïnvloed. Bladeren van *Nicotiana glutinosa*, met symptomen van stoppelknolvirus (19 dagen tevoren besmet), werden gedurende 5 min. in water van verschillende temperaturen gedompeld. Voor iedere serie werden 10 *Myzus persicae* gebruikt, die gedurende 15 sec. boorden. Op een bladstuk van White Burley tabak werd hun besmetting nagegaan. Tevens werd het sap van de fijngewreven bladeren op bladstukken White Burley tabak uitgewreven.

TABEL 11. Invloed van een temperatuurbehandeling van 5 min. op de overbrenging van het stoppelknolvirus door *Myzus persicae* uit ziek blad van *Nicotiana glutinosa* en op de mechanische overbrenging met behulp van carborundum.

TABLE 11. *Influence of a 5 minutes dip of an infected leaf of Nicotiana glutinosa in water at different temperatures on the transmission of cabbage blackring virus by Myzus persicae and by mechanical transmission. Infection feeding time 15 sec. Test feeding time on White Burley tobacco 24 hours.*

Temperatuur *Temperature*	Aantal vlekken, die 10 *Myzus persicae* op White Burley veroorzaakten *Number of local lesions caused by 10 aphids*	Aantal vlekken na uitstrijk met carborundum op 3 White Burley bladeren *Number of local lesions with carborundum*
5 min. in water van 40° C.	9	619
5 min. in water van 42° C.	11	422
5 min. in water van 44° C.	11	1134
5 min. in water van 46° C.	6	1232
5 min. in water van 48° C.	3	412
5 min. in water van 50° C.	2	157

Deze proef (tabel 11) laat zien, dat stoppelknolvirus uit bladeren verwarmd boven 44° C., in mindere mate wordt overgebracht. Een herhaling van deze proef (wat betreft de mechanische overbrenging), waarbij — gezien de grote variabiliteit in gevoeligheid van het materiaal — echter acht bladstukjes van White Burley per object werden gebruikt, gaf hetzelfde resultaat (tabel 12).

TABEL 12. Mechanische overbrenging van het stoppelknolvirus uit besmette bladeren van *Nicotiana glutinosa*, die een warmtebehandeling hadden ondergaan, op acht stukken White Burley tabak.

TABLE 12. *Mechanical transmission of cabbage blackring virus onto eight leaf parts of White Burley tobacco out of infected leaves of Nicotiana glutinosa dipped in hot water.*

Behandeling *Treatment*	Totaal aantal vlekjes op 8 bladstukjes White Burley tabak *Number of local lesions on 8 leaf parts White Burley tobacco*
Controle	603
5 min. in water van 35° C.	952
5 min. in water van 40° C.	806
5 min. in water van 42° C.	829
5 min. in water van 44° C.	1024
5 min. in water van 46° C.	852
5 min. in water van 48° C.	354
5 min. in water van 50° C.	98

Uit de voorgaande proeven blijkt, dat het mechanisch overbrengen van virus uit zieke bladeren, door een kortstondige warmtebehandeling tot vrij hoge temperaturen, nauwelijks wordt beïnvloed en dan zeker niet in

ongunstige zin, maar dat boven een bepaalde grens (46-48° C.) inactivering van het virus begint. Reeds voordat de grens is bereikt, waarbij duidelijk inactivering van het virus begint op te treden, ondervinden — volgens de tabellen 10 en 11 — bladluizen moeilijkheden met de virusoverbrenging.

Om nader te worden ingelicht over de processen, die in het blad hebben plaatsgevonden, hebben wij sap van zieke bladeren, die afkomstig waren uit de diepvriescel (-20° C.), dan wel 30 minuten bij 50° C. verhit waren of onbehandeld bleven, uitgesmeerd op 4 bladstukken van White Burley tabak. Ook werd na centrifugeren van dit sap gedurende 30 minuten bij 8000 toeren een uitstrijk gemaakt, zowel van de bovenstaande vloeistof als van het neerslag. Dit neerslag was tevoren gesuspendeerd in water tot de hoeveelheid sap waarvan was uitgegaan.

TABEL 13. Analyse op virusgehalte van het fijngewreven blad en van de bovenstaande vloeistof en het neerslag, verkregen na centrifugeren van perssap uit bladeren van *Nicotiana glutinosa*, besmet met het stoppelknolvirus. Deze bladeren hadden in de diepvries of in warm water gelegen of hadden geen behandeling ondergaan.

TABLE 13. *Analysis of virus content of the pulverized leaves of Nicotiana glutinosa, infected with cabbage blackring virus, and of the precipitate and supernatant fluid after centrifugation of sap from these leaves, tested on leaves of White Burley tobacco. The infected leaves were left untreated, deep-frozen or dipped in hot water.*

Behandeling *Treatment*	Aantal vlekjes op 4 bladstukken White Burley tabak na uitstrijk van: *Number of local lesions on 4 leaf parts of White Burley tobacco:*		
	Fijngewreven blad *Pulverized leaf*	Bovenstaande vloeistof *Supernatant liquid after centrifugation*	Neerslag *Precipitate*
Controle	21	101	2
30 min. bij 50° C.	6	0	50
Bevroren —20° C. *Deep-frozen* —20° C.	127	80	19

Uit deze proef blijkt het volgende. Na diepvriezen bij -20° C. verkrijgt men meer lokale vlekken uit het fijngewreven blad en uit het neerslag, terwijl met de bovenstaande vloeistof weinig verandering in de mate van infectiositeit is opgetreden. Verwarming blijkt een geheel andere invloed te hebben. Het neerslag bevat in absolute zin meer infectieuze deeltjes en in relatieve zin ten opzichte van de bovenstaande vloeistof buitengewoon veel meer. Diepvriezen maakt blijkbaar meer virus vrij, zonder de toestand van dit virus te veranderen. Verwarming heeft een nadelige invloed, hoewel het virus niet geheel geïnactiveerd wordt. Blijkbaar coaguleert het virus tijdens deze bewerking en slaat met andere sapbestanddelen neer.

Men zou op grond van bovenstaande resultaten mogen verwachten, dat, waar diepvriezen de binding tussen virus en andere bladbestanddelen losser maakt, bladluizen gemakkelijker virus kunnen opnemen uit blad, dat bevroren is geweest, maar tabel 9 wijst uit, dat het omgekeerde het geval is: na diepvriezen nemen bladluizen geen virus meer op uit het blad.

2. INVLOED VAN HET DODEN VAN HET VIRUSZIEKE BLAD DOOR MIDDEL VAN CHEMICALIEN OP DE VIRUSOVERBRENGING UIT DIT BLAD

Uit de resultaten van voorafgaande proeven krijgt men de indruk, dat de virusoverbrenging door een bladluis gebonden is aan het levend zijn van het blad. Immers zowel beschadiging van het blad door voorafgaande afkoeling als door verhitting maakt het bladluizen onmogelijk virus uit het blad op te nemen, ook al is het virus zelf in een bepaald geval niet minder actief geworden. Door nu de bladeren op een andere manier te doden en wel met behulp van chemicaliën, wilden wij nagaan, of deze opvatting juist is. Door de bladeren in bepaalde chemische stoffen te dompelen, verdween na enkele minuten de lucht uit de intercellulaire ruimten van het bladweefsel en de bladkleur veranderde daardoor. De proef werd uitgevoerd met bladeren van tuinboonplanten, die duidelijke symptomen van lupinemozaïek vertoonden. Steeds werden 20 toetsplanten gebruikt, waarop één *Myzus persicae* geplaatst werd, die 15 seconden op de behandelde bladeren gezogen had. De bladeren waren afgespoeld voordat de bladluizen erop gezet werden, maar bevatten nog de stoffen, waarmede ze behandeld waren. De aanwezigheid van de stoffen, waarmede geïmpregneerd werd, verhinderde een bladluis niet een normaal steekproces in het blad uit te voeren. Voor zover moeilijkheden met het inboren schenen op te treden, leken deze te correleren met de mate waarin het blad als gevolg van de behandeling verslapt was.

TABEL 14. De overbrenging van het lupinemozaïekvirus door *Myzus persicae* uit bladeren van tuinboon, die met bepaalde chemicaliën waren behandeld.

TABLE 14. *Transmission of lupin mosaic virus by Myzus persicae out of infected leaves of broadbean, which had been dipped in different chemicals.*

Behandeling *Treatment*	Aantal zieke planten uit een totaal van 20 *Number of diseased plants out of 20*
Alcohol 96%	4 (I), 2 (II)
Aceton, *acetone*	0 (I), 0 (II)
Controle, *control*	16 (I), 15 (II), 17 (III)
Aether, *ether*	0
Tetrachloorkoolstof, *carbon tetrachloride*	0
Formaline 40%, *formalin*	0

Sommige series werden herhaald, hetgeen in de tabel is aangegeven door romeinse cijfers achter de proefresultaten. Uit deze proef (tabel 14) blijkt, dat *Myzus persicae* geen virus overbrengt uit bladeren, die gedompeld zijn geweest in aceton, aether, tetrachloorkoolstof en formaline 40%. Behandeling met deze stoffen veroorzaakte terstond slap worden van het blad. Een geringe overdracht werd gevonden bij bladeren, die in alcohol 96% waren gedompeld. Bij deze bladeren was niet alle lucht uit de intercellulaire ruimten verdwenen en bovendien werd dit blad, nadat het onder-

gedompeld was, niet zo snel slap. Wij twijfelden er daarom aan, of wel alle cellen van het blad gedood zouden zijn. Daarom hebben wij de behandeling uitgevoerd door blad met alcohol te impregneren, nadat met een waterstraalluchtpomp via een exsiccator de lucht uit het blad verwijderd was. Ook na deze behandeling werden de bladeren niet terstond slap, hoewel ze later vrij snel hun turgor verloren. De cellen waren in dit geval opgestijfd door de opgenomen alcohol en waren nu zeker dood. Overbrenging van het virus door een bladluis vond nu niet meer plaats. Langs mechanische weg bleek, dat met perssap, gemaakt van de met alcohol geïmpregneerde bladeren, nog altijd vier planten uit een totaal van twintig geïnfecteerd konden worden. Bij de controle waren dit 15 van de 20 planten.

3. INVLOED VAN HET IMPREGNEREN VAN ZIEKE BLADEREN MET WATER OF MET PLANTESAP OP DE VIRUSOVERBRENGING

Het is niet uitgesloten, dat de protoplasten een verhoogde permeabiliteit vertonen als gevolg van de mechanische prikkeling veroorzaakt door het aftrekken van de epidermis (zie hoofdstuk VI pag. 34). De invloed van overmatig vocht in de celwanden hebben wij trachten na te gaan door bladeren van tuinbonen, die symptomen van het lupinemozaïekvirus vertoonden, gedurende een half uur vacuüm te zuigen met behulp van een waterstraalluchtpomp. De bladeren waren in een bekerglas in water of in sap van gezonde boneplanten ondergedompeld, zodat tijdens de luchttoevoer het blad met water of met tuinboonsap werd geïmpregneerd. De virusoverbrenging uit deze bladeren en uit controlebladeren gingen wij met behulp van *Myzus persicae* na. De bladluizen hadden vooraf gevast en staken gecontroleerd 15 sec. op de objecten.

TABEL 15. Virusoverbrenging door *Myzus persicae* uit met lupinemozaïekvirus besmette tuinboonbladeren, die vooraf geïmpregneerd waren met water of sap van gezonde tuinboonbladeren.

TABLE 15. *Virus transmission by Myzus persicae out of broadbean leaves infected with lupin mosaic virus. The infected broadbeen leaves were left untreated or had been impregnated with water or sap of healthy broadbean plants.*

Behandeling van het zieke blad *Treatment of the diseased leaves*	Aantal zieke planten uit 20 *Number of infected plants out of 20*	
	1e proef, *first replicate*	2e proef, *second replicate*
Controle	5	14
Impregnatie met water *Impregnation with water*	10	10
Impregnatie met gezond sap *Impregnation with healthy sap*	5	15

Van enige invloed van het impregneren met water of met gezond sap op de virusoverbrenging is dus geen sprake.

4. INVLOED VAN HET VOCHTGEHALTE VAN HET ZIEKE BLAD OP DE VIRUSOVERBRENGING

In zekere zin vormen deze proeven een tegenhanger van de onder hoofdstuk VI, 3 besproken proeven. Door het onttrekken van vocht aan het hele blad drogen ook de celwanden uit. Met glycerine-water mengsels werden in erlenmeyers verschillende relatieve luchtvochtigheden verkregen. De zieke bladeren werden in deze ruimten aan een draadje opgehangen, met een stop werden de erlenmeyers afgesloten en bij kamertemperatuur weggezet. Na één dag werden bladluizen 15 sec. op het blad geplaatst om na te gaan of er nog virusoverdracht plaats kon vinden. Op iedere toetsplant werd één *Myzus persicae* geplaatst. De resultaten van deze proef geven wij weer in tabel 16, terwijl wij de uitkomsten van een herhaling van deze proef in tabel 17 weergeven.

TABEL 16. Overbrenging van het lupinemozaïekvirus door *Myzus persicae* uit tuinboonbladeren, die gedurende één dag in een ruimte bij verschillende relatieve luchtvochtigheden hadden gehangen.

TABLE 16. *Transmission of the lupin mosaic virus by Myzus persicae out of infected broadbean leaves. The infected leaves were hung in rooms during 24 hours with different relative humidities.*

Relatieve luchtvochtigheid *Relative humidity*	Aantal zieke tuinboonplanten uit een serie van 15 stuks *Number of diseased broadbean plants out of 15*
100%	15
90%	5
70%	0
30%	2
0%	0

In de volgende proef (tabel 17) werd bovendien nagegaan, of na wateropname — na onderdompeling van bladeren, die eerst aan een droogproces waren onderworpen — het opnemen van virus door bladluizen meer of minder gemakkelijk verliep.

TABEL 17. Proef als tabel 16, bovendien werd de overbrenging nagegaan na het weer turgescent worden van het blad. Twintig proefplanten werden per serie gebruikt.

TABLE 17. *The same experiment as in table 16; in addition the transmission was determined after the leaves were turgid again. For each series 20 test plants were used.*

Relatieve luchtvochtigheid *Relative humidity*	Overbrenging uit het ingedroogde blad *Transmission from the treated leaf*	Overbrenging uit het weer opgestijfde blad *Transmission from the leaves after they were turgid again*
100%	7	—
90%	8	7
70%	4	7

Uit de tabellen 16 en 17 blijkt, dat uitdrogen van het blad in sterke mate het opnemen van virus door bladluizen belemmert. Dat de over-

brenging na het weer turgescent worden van het blad verbetert, blijkt niet overtuigend, doch is geenszins uitgesloten.

Met bladeren van *Nicotiana glutinosa*, besmet met het stoppelknolvirus, hebben wij deze proef herhaald. Het zieke *Nicotiana glutinosa* blad bleef 24 uur in erlenmeyers bij de verschillende luchtvochtigheden hangen. *Myzus persicae*, die een vasttijd had doorgemaakt, mocht 15 sec. op deze bladeren steken. Per behandeling werden 2 maal 10 bladluizen gebruikt, die op 2 bladstukjes White Burley tabak op hun virusoverbrenging getoetst werden. Het weer turgescent worden van de bladeren werd bereikt door de bladeren gedurende enige uren op water te laten drijven. Zodra de bladeren goed stijf geworden waren, werden ook hierop de bladluizen geplaatst, nadat echter het blad eerst met filtreerpapier afgevloeid was.

TABEL 18. Overbrenging door *Myzus persicae* van het stoppelknolvirus uit besmette bladeren van *Nicotiana glutinosa*. De geïnfecteerde bladeren waren ingedroogd in ruimten bij verschillende luchtvochtigheid en hadden daarna in water hun turgescentie weer teruggekregen.

TABLE 18. *Transmission of cabbage blackring virus by Myzus persicae from infected leaves of Nicotiana glutinosa. The leaves had been dried in rooms with different humidity and had regained their turgidity by dipping in water.*

Relatieve luchtvochtigheid *Relative humidity*	Aantal lokale vlekjes op White Burley tabak *Number of local lesions on White Burley tobacco*	
	Overbrenging door *Myzus persicae* uit ten dele ingedroogde bladeren *Transmission by M.p. out of partly dried leaves*	Overbrenging uit dezelfde bladeren na herstel van turgescentie *Transmission out of the same leaves after regained turgidity*
100%	4 en 11	—
90%	6 en 8	4 en 6
70%	0 en 0	4 en 14

Dat de overbrenging door *Myzus persicae* sterker achteruitgaat naarmate het blad, dat als infectiebron dient, meer is uitgedroogd, komt in tabel 18 naar voren. Bovendien blijkt duidelijk, hetgeen in tabel 17 bij 70% luchtvochtigheid reeds werd gesuggereerd, dat herstel van de turgescentie ook de opname van virus door bladluizen weer gemakkelijker maakt. De turgescentie van het blad bepaalt dan in belangrijke mate de opneembaarheid van het virus door een bladluis.

Hoe verloopt nu de *mechanische* overbrenging op bladeren, die in ruimten met verschillende luchtvochtigheid hebben gehangen? Om dit na te gaan hebben wij vijf gezonde bladeren van *Nicotiana glutinosa* van 's middags 5 uur tot 's morgens 9 uur in erlenmeyers gehangen, waarin luchtvochtigheidsgraden heersten van resp. 100, 90, 80, 60 en 0%. De bladeren waren toen resp. 0,2; 8,5; 12; 19,3 en 31,8% ingedroogd. Het percentage indroging werd bepaald door de bladeren vóór en na het verblijf in de erlenmeyers te wegen. Van deze bladeren werd de ene bladhelft direct met behulp van carborundum geïnoculeerd met T.M.V., de andere blad-

helft werd op water gelegd en zes uur later geïnoculeerd. Na het inoculeren werden de bladeren in petrischalen op vochtig filtreerpapier gelegd.

TABEL 19. Mechanische overbrenging van T.M.V. op bladeren van *Nicotiana glutinosa*, nadat deze 16 uur waren ingedroogd en later door dompeling in water weer turgescent geworden waren.

TABLE 19. *Mechanical transmission of T.M.V. on partly desiccated leaves of Nicotiana glutinosa as well as on leaves which were floated on water during 6 hours after the 16 hours of drying.*

Luchtvochtigheid *Relative humidity*	Perc. indroging *Loss of weight in % after drying*	Lokale vlekken op ingedroogde bladeren *Local lesions on dried leaves*	Lokale vlekken na 6 uur optrekken in water *Local lesions after 6 hours floating on water*
100%	0,2	317	269
90%	8,5	262	224
80%	12,0	95	346
60%	19,3	4	344
0%	31,8	0	342

Uit deze proef (tabel 19) blijkt, dat op ingedroogd blad de mechanische overbrenging van het virus duidelijk bemoeilijkt wordt. Het is echter een omkeerbaar proces, want na herstel van de turgescentie worden op de bladeren weer evenveel lokale vlekjes gevormd als op de bladeren waaraan geen water onttrokken is.

Het resultaat van deze proef noopte ons nu de infecteerbaarheid van ingedroogde bladeren door middel van bladluizen te onderzoeken. Hiertoe maakten wij gebruik van *Myzus persicae*, die een vasttijd had doorgemaakt. Wij lieten deze daarna gedurende 15 sec. steken op een met stoppelknolvirus besmet blad van *Petunia*, waarna ze gedurende een uur op bladeren van White Burley tabak geplaatst werden. Deze bladeren hadden gedurende 18 uur in een gesloten ruimte bij verschillende luchtvochtigheden

TABEL 20. Overbrenging van het stoppelknolvirus uit besmette *Petunia* bladeren door *Myzus persicae* in een zuigtijd van 15 sec. Toetsbladeren waren bladstukken van White Burley tabak, die gedurende 18 uur in ruimten met verschillende luchtvochtigheid hadden gehangen. Op ieder bladstuk werden 5 bladluizen gedurende 1 uur geplaatst, waarna het blad weer stijf kon worden.

TABLE 20. *Transmission of cabbage blackring virus from diseased leaves of Petunia. Infection feeding time 15 sec. Test feeding time 1 hour on leaf parts of White Burley tobacco (5 aphids on each). These leaf parts were dried during 18 hours in rooms with different humidity. Afterwards the test leaves were floated on water.*

Luchtvochtigheid *Relative humidity*	Aantal lokale vlekken op ingedroogde bladeren *Number of local lesions on dried leaf parts*				
100%	7	6	6	2	2
90%	2	1	5	1	2
80%	5	4	3	3	4
60%	2	1	3	3	0
0%	5	1	4	4	2

gehangen. Nadat de bladluizen van de bladeren verwijderd waren, lieten wij de bladeren weer turgescent worden door ze op water te laten drijven.

Het resultaat van deze proef (tabel 20) is zeer verrassend. Immers mechanische infectie van blad waaraan een deel van het water was onttrokken, bleek bijna of geheel onmogelijk, maar voor bladluizen vormt het al of niet turgescent zijn van het blad tijdens het overbrengingsproces volgens tabel 20 geen belemmering bij het infecteren met virus. Wij herinneren er nogmaals aan, dat het opnemen van virus door bladluizen uit blad waaraan een deel van het water onttrokken was, wel degelijk moeilijkheden bleek op te leveren (tabel 16). Het virus wordt blijkbaar door de bladluis in het behandelde bladweefsel gebracht en wanneer het blad, dat op het vochtige filtreerpapier weer langzamerhand turgescent wordt en zijn levensprocessen hervat, heeft virusvermeerdering plaats.

5. PROEVEN GENOMEN MET EEN KUNSTMATIGE CEL OM DE INVLOED VAN DE HOGE DRUK OP DE VIRUSOVERBRENGING NA TE GAAN *)

Een mogelijkheid, die wij reeds aanstipten (hoofdstuk II, pag. 9), voor het niet opnemen van virus uit een afgetrokken epidermis is, dat een bladluis uit weefsel of vloeistof geen voedsel kan opnemen, indien daarin geen overdruk heerst (Kennedy & Mittler 1953). Door het aftrekken van de epidermis kunnen veranderingen zijn opgetreden, waardoor de celspanning is afgenomen en ook de spanning in de celwand is verminderd. Wij onderzochten niet de osmotische waarde van het celvocht in de afgetrokken epidermis.

Over het voedselopnemen door bladluizen is weinig anders bekend dan dat voedsel door de plant in een bladluis wordt geperst (Kennedy & Mittler 1953). Dit wijst er volgens Mittler (1953) op, dat voedsel uit het floëem wordt opgenomen. De vraag is nu of vóór het floëem bereikt is een stekende bladluis reeds voedsel of althans vloeistof uit de plant opneemt. Het bewijs voor deze veronderstelling is nog niet geleverd. Daar volgens Kennedy (1951) de definitieve keuze van waardplant eerst gedaan wordt na inboren in de plant, mag men aannemen, dat een bladluis, afgezien van het waarnemen van chemische substanties op het bladoppervlak, ook chemische prikkels ontvangt van het inwendige van de plant. Dit zou alleen kunnen plaatsvinden, indien voedsel tenminste tot de faryngiale holte van de bladluis doordringt. De stiletten zelf zijn niet geïnnerveerd, zodat het ontvangen van chemische prikkels eerst mogelijk is, wanneer het front van een vloeistofstroom in het voedselkanaal de stiletten van top tot basis is gepasseerd. Hieruit volgt, dat indien enige waardplantenkeuze plaatsvindt tussen het doorboren van de buitenwand van de epidermis en het bereiken van het floëem, dit slechts kan plaatsvinden, indien een substantie uit de plant de mondholte van een bladluis bereikt.

---

*) Bij dit deel van het onderzoek was Ir. C. L. M. van Eynatten mij behulpzaam, waarvoor ik hem mijn dank betuig.

Uit proeven van VAN SOEST & DE MEESTER-MANGER CATS (1956) is gebleken, dat in de vloeistof, die uit een afgesneden stilettenbundel treedt, geen T.M.V. was aan te tonen. Zij nemen aan, dat — gezien de grote concentratie van dit virus in de plant — het ontbreken van dit virus in het bladluisvoedsel een gevolg is van een filtratie, vóór het voedsel het uiteinde van het voedselkanaal binnendringt. Reeds eerder had SUKHOV (1944) gewezen op de mogelijkheid dat T.M.V. de speekselschede niet kan doordringen.

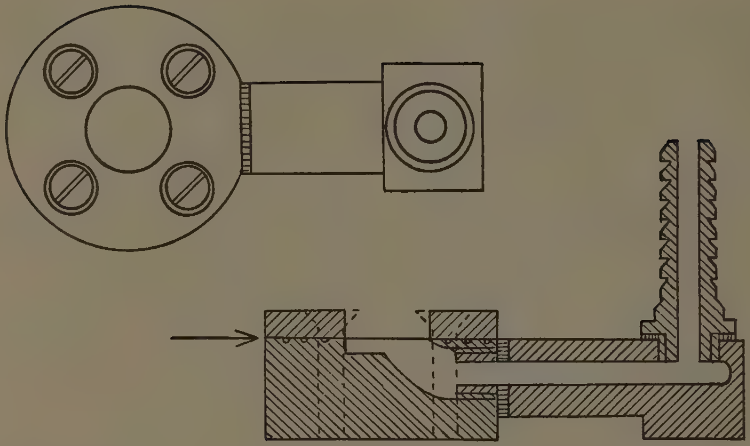
Er is reden om aan te nemen, dat, althans vóór het bereiken van het floëem, dat door intercellulair boren wordt bereikt, voedsel door en uit de celwanden door de buitenwand van de speekselschede naar het lumen diffundeert en daarna in het voedselkanaal in de stiletten wordt opgenomen.

Daar speeksel- en voedselkanaal geen gescheiden uitgangen buiten de stiletten hebben en een bladluis tijdens het inboren speeksel produceert, is het moeilijk voor te stellen hoe gelijktijdig iets anders dan speeksel in het voedselkanaal zou kunnen doordringen. Uit de rechtstreekse waarneming over de vorming van de speekselschede is ons evenwel bekend, dat de speekselafscheiding niet continu verloopt, maar intermitterend, zoals ook aan de vorm van de in foto 16 afgebeelde speekselschede is te zien. Tijdens het binnendringen van de stiletten in de plant heeft dus de ejaculatie van speeksel met korte intervallen plaats, gedurende welke vloeistof in het voedselkanaal kan binnendringen. Bovendien is het binnendringen van de stiletten zelf niet continu. Ze worden af en toe teruggetrokken, waarbij de speekselafscheiding stopt en zich het lumen van de speekselschede voorbij de teruggetrokken stilettenbundel met vloeistof kan vullen. Er is dus tijdens het boorproces voldoende gelegenheid voor het binnendringen van sap uit de plant in het voedselkanaal tussen de maxillaire stiletten. In alle gevallen zal het voedsel onder overdruk in een bladluis geperst worden. Indien dit voedsel ook virus bevat en het virus zich gedurende de overdracht binnen de stiletten bevindt, zou men zich kunnen voorstellen, dat bij vermindering van druk in de plant voedsel noch virus in de bladluis wordt geperst. Dit zou kunnen verklaren, waarom virusoverdracht uit droge of verslapte bladeren vrijwel niet lukt, wanneer van bladluizen gebruik wordt gemaakt.

Om dit nader te onderzoeken construeerden wij een kunstmatige cel, die in tekening 7 schematisch wordt weergegeven.

HAMILTON (1935) werkte reeds met een kunstmatige cel, die niet onder druk stond. Het was echter allerminst duidelijk, dat uit deze cel ook vloeistof door een bladluis werd opgenomen. Zo bedroeg de afname in gewicht van 200 bladluizen, die vooraf gevast hadden, na voeding op haar kunstmatige cel 0,0110 gram en de toename in gewicht van 400 bladluizen slechts 0,0066 gram. Uit een turgescent blad namen 400 bladluizen echter 0,0315 gram voedsel op.

In een plantecel heerst een druk van 6-12 atm. Wij hebben nagegaan of wij deze druk in een kunstmatige cel konden bereiken en bovendien of het vliesje, dat deze cel afsluit, door de bladluis doorstoken kan worden. Na enig experimenteren bleek deze opgaaf te verwezenlijken (tekening 7).



Tekening 7
Dwarse doorsnede en bovenaanzicht van de koperen hoge drukcel, die gevuld met plantesap, aangesloten kan worden op een cylinder lucht onder 12 atm. spanning. Op de plaats van de pijl bevindt zich achtereenvolgens van beneden naar boven een rubberring 1 mm dik, een velletje plastic 0,05 mm, nylon gaas en een tweede rubberring.

Fig. 7
Transverse section and dorsal view of the high pressure cell. After filling the cell with plant juice, it can be connected with a cylinder with air under 12 atmospheres. At the place indicated by the arrow are from top to bottom a rubber ring of 1 mm, a plastic membrane of 0,05 mm, nylon gauze, and a second rubber ring, resp.

Een bladluis steekt goed door een membraan van polyaethyleen ter dikte van 0,05 mm. Hiervoor heeft zij bij het ontbreken van druk gemiddeld 38,5 sec. nodig. Dit gemiddelde is berekend uit 24 waarnemingen, waarvan de uitersten 25 en 80 sec. waren. Van deze 24 bladluizen werden door 19 wel en door 5 geen speekselafdruk van de labiumtop op het polyaethyleenvlies gemaakt.

Eerst werd met een suspensie van lupinemozaïekvirus uit tuinbonen gewerkt, die gebracht werd onder 6-8 atm. spanning. Een 62-tal bladluizen, die gemiddeld 54,4 sec. hadden gezogen op het plastic membraan, waaronder deze suspensie zich bevond, werd vervolgens op gezonde tuinboonplanten geplaatst (tabel 21). Geen van deze planten werd echter ziek. Na afloop konden met het sap uit de cel wel mechanisch tuinboonplanten ziek gemaakt worden. Daar het virus te veel gebonden zou kunnen zijn aan de normale celbestanddelen en zodoende voor de bladluis niet opneembaar zou zijn, werd deze proef herhaald met helder gecentrifugeerd sap.

De cel werd nu gevuld met sap van een zieke tuinboon, dat vooraf gedurende 30 minuten bij 6000 toeren per minuut gecentrifugeerd was. Zowel met de heldere vloeistof na het centrifugeren, als met de vloeistof uit de cel, nadat de bladluizen hierop gezogen hadden, konden langs mecha-

nische weg planten worden geïnfecteerd. Van de 17 bladluizen, die op de cel onder druk gezogen hadden, bracht er echter niet één virus over (tabel 21). Uiteraard was moeilijk na te gaan of de bladluizen inderdaad vloeistof uit de kunstmatige cel opnamen.

Deze proef werd herhaald met het stoppelknolvirus, waarbij de bladluizen op White Burley tabak werden gezet. Een 20-tal bladluizen brachten echter ook hier geen virus over. Ook centrifugeren van het zieke sap gedurende 20 minuten bij 10.000 toeren gaf geen verbetering van de resultaten. Bij deze proef werden 50 bladluizen gebruikt (tabel 21).

TABEL 21. Virusoverbrenging door *Myzus persicae*, die hun stiletten door een membraan heen in een virusoplossing steken, die onder een druk van 6-8 atm. staat.

TABLE 21. *Transmission of virus by Myzus persicae, that stuck their stylets in a virus suspension which was under a pressure of 6-8 atm.*

Virusbron *Virus source*	Overbrenging *Transmission*
a. Sap uit blad van plant, besmet met lupinemozaïekvirus, ongecentrifugeerd *Sap from a plant infected with lupin mosaic virus, not centrifuged*	0/62
b. Als a, gecentrifugeerd gedurende 30 min. bij 6000 toeren per minuut *As in a, but centrifuged during 30 min. at 6000 r.p.m.*	0/17
c. Sap uit blad van plant, besmet met stoppelknolvirus, ongecentrifugeerd *Sap from a plant with cabbage blackring virus, not centrifuged*	0/20
d. Als c, gecentrifugeerd gedurende 20 minuten bij 10.000 toeren per minuut *As in c, but centrifuged during 20 min. at 10.000 r.p.m.*	0/50

Om te onderzoeken of inderdaad vocht opgenomen wordt uit de hoge drukcel brachten wij hierin een oplossing van radioactieve glucose en fructose waar C^{14} ingebouwd was. Een 20-tal bladluizen, die op deze sterk radioactieve oplossing gecontroleerd geboord hadden (ieder minstens 30 sec. in verband met de tijd, die nodig is voor het doorboren van het polyaethyleenvliesje), vertoonden onder de Geiger-teller echter geen spoor van radioactiviteit. Mogelijk, dat de hoeveelheden vloeistof, die de bladluis in de betrekkelijk korte zuigtijd opneemt, zo gering zijn, dat ook geen meetbare ionisatie verkregen kan worden.

Wij hebben daarom een 20-tal *Myzus persicae* gedurende 15 uur op de hoge drukcel geplaatst (tabel 22). De cel was weer gevuld met water, waarin de radioactieve suikers opgelost waren en stond onder 6-8 atm. druk. Tegelijkertijd gebruikten wij 20 *Myzus persicae*, die direct na de vangst gedood werden. Bovendien plaatsten wij een aantal bladluizen gedurende 15 uur op een hoge drukcel, maar de radioactieve vloeistof hierin bevond zich niet onder druk.

TABEL 22. Radioactiviteit van groepen van 20 bladluizen, die elk 5 × 3 min. onder de Geiger-teller geplaatst werden, na verschillende voorbehandelingen.

TABLE 22. *Radioactivity of groups of 20 aphids placed under the Geiger-counter 5 times for 3 minutes, alternated with counts without aphids.*

Behandeling *Treatment*	Uitslag Geiger teller *Radioactivity with Geiger counter* Met bladluizen *With aphids*		Zonder bladluizen *Without aphids*		Verschil *Difference*
a. Zuigtijd minstens 30 sec. op radioactieve vloeistof door membraan onder druk van 6-8 atm. *Feeding time at least 30 sec. on radioactive liquid under a pressure of 6-8 atm.*	161 138 163 169 143	154,8	186 163 152 137 132	155,2	M = + 0,8 *) $S\bar{x}$ = 11,2
b. Bladluizen gedurende 15 uur op membraan geplaatst, waaronder radioactieve vloeistof onder druk *Aphids placed for 15 h. on plastic membrane under which radioactive liquid at 6-8 atm.*	180 181 174 190 204	185,8	141 160 145 137 151	146,8	M = + 39,0 $S\bar{x}$ = 6,4
c. herhaling van b *repetition of b*	153 191 177 184 170	175,0	140 144 149 150 150	146,6	M = + 28,4 $S\bar{x}$ = 5,9
d. Bladluizen, die niet zogen op radioactieve vloeistof *Aphids immediately killed after being taken from the plant*	130 125 156 169 127	141,4	135 145 129 144 162	143	M = + 1,6 $S\bar{x}$ = 12,2
e. Bladluizen gedurende 15 uur op membraan, waaronder radioactieve vloeistof, echter niet onder druk *Aphids placed on plastic membrane, under which was radioactive liquid without pressure, during 15 h.*	132 142 158 143 142	143,4	161 150 134 132 127	140,8	M = + 2,6 $S\bar{x}$ = 9,5

*) M = het gemiddelde verschil tussen behandelde bladluizen en blanco.
the mean difference between treated aphids and the blank.

$S\bar{x}$ = standaardafwijking, *standard deviation.*

Bij de wiskundige verwerking werd de t-toets voor gepaarde waarnemingen gebruikt, aangezien steeds afwisselend van een groep behandelde bladluizen en van een blanco waarneming de uitslag van de Geiger-teller werd nagegaan. Uit de cijfers blijkt nogmaals, dat de bladluis niet actief zuigt, maar alleen vloeistof tot zich neemt, indien deze onder druk staat (tabel 22).

Om de hoeveelheid sap, die in korte tijd in de bladluis geperst wordt op te voeren en omdat mogelijk in de plantecel een hogere druk heerst, hebben wij de druk verhoogd tot 10-12 atmosfeer. Ook nu brachten een 23-tal bladluizen, die op de cel op een vooraf gecentrifugeerde oplossing van stoppelknolvirus hadden gezogen geen virus uit de vloeistof op blaadjes van White Burley tabak over.

6. INVLOED VAN HET MECHANISCH VERWONDEN VAN ZIEKE BLADEREN OP DE VIRUSOVERBRENGING

Kunnen de cellen door het aftrekken van de epidermis soms zo verwond zijn, dat daaruit geen opname van virus meer kan plaatsvinden? Is dit misschien door een behandeling van een intact blad na te bootsen?

Wij hebben om dit doel te bereiken met een horlogeglaasje zolang op de zieke bladeren gedrukt, totdat de lucht uit de intercellulaire ruimten verdwenen was. Wij gebruikten weer tuinboonbladeren met symptomen van lupinemozaïekvirus en als vector *Myzus persicae*, die 15 sec. in de infectiebron boorde, na voorafgaande vasttijd. Tevens herhaalden wij deze proef met bladeren van *Nicotiana glutinosa*, besmet met het stoppelknolvirus, en White Burley tabak als toetsplant.

TABEL 23. Overbrenging van het lupinemozaïekvirus en het stoppelknolvirus uit zieke bladeren van resp. tuinboon en *Nicotiana glutinosa* door *Myzus persicae*. Deze bladeren waren tevoren met een horlogeglas zolang gedrukt, totdat de lucht uit de intercellulaire ruimten was verdwenen.

TABLE 23. *Transmission by Myzus persicae of lupin mosaic virus and cabbage blackring virus from infected leaves of broadbean and Nicotiana glutinosa respectively. These leaves were pressed with the aid of a watch glass until the air had disappeared from the intercellular spaces. Preliminary fasting time some hours, infection feeding time 15 sec.*

Behandeling *Treatment*	Aantal tuinboonplanten met lupinemozaïekvirus uit een totaal van 20 *Number of diseased broadbean plants out of a total of 20*	Aantal vlekken van stoppelknolvirus op White Burley tabak veroorzaakt door 30 luizen *Number of local lesions caused by 30 aphids on White Burley tobacco*
Onbehandeld blad *Untreated leaf*	12	4
Gekneusd blad *Pressed leaf*	6	8

Door het zieke blad tussen de vingers te rollen werd op een andere manier nagegaan, of dit de virusoverdracht ongunstig zou beïnvloeden.

TABEL 24. Invloed van het rollen van tuinboonblad besmet met lupinemozaïekvirus op de virusoverbrenging door *Myzus persicae.*

TABLE 24. *Influence of the rolling between the hands of broadbean leaves infected with lupin mosaic virus on the transmission of the virus by Myzus persicae.*

Behandeling *Treatment*	Aantal zieke planten uit een serie van 20 *Number of diseased plants out of a total of 20*	Aantal zieke planten uit een serie van 12 *Number of diseased plants out of a total of 12*
Onbehandeld blad *Untreated leaf*	10 = 50%	10 = 83%
Ziek blad gerold *Rolled leaf*	10 = 50%	5 = 42%

Uit deze proeven blijkt, dat een bladluis in staat is, het virus ongeveer even goed uit gekneusde als uit intacte bladeren over te brengen (tabellen 23 en 24). Mogelijk waren deze beschadigingen nog niet sterk genoeg. Tijdens het aftrekken van de epidermis worden de cellen stuk voor stuk uitgerekt en over elkaar gerold en bovendien wordt de epidermis van het onderliggende sponsparenchym losgescheurd. Hierbij zijn de beschadidigingen waarschijnlijk sterker dan bij bovenstaande proeven, waarbij vooral het zachte parenchym het eerst wordt beschadigd. Door het vernietigen van het mesofyl door druk tussen duim en wijsvinger vond ook BRADLEY (1952) bij tabak, besmet met het „*Datura wilt virus*", geen verminderde virusoverbrenging door *Myzus persicae.*

Om op een andere manier stukjes epidermis te verkrijgen, waarbij de mechanische ingreep minder rigoureus is, werden van de onderkant van zieke tuinboonbladeren schilfertjes afgesneden. Bladluizen konden hierop zuigen en genoteerd werd of zij op het doorzichtige gedeelte van de epidermis zogen of op het gedeelte waarbij nog enig bladgroen van het sponsparenchym was meegesneden. De zuigtijd van de bladluizen werd bij deze proef niet afgebroken. Bij deze proef bedroegen de zuigtijden voor de bladluizen, die wel virus overbrachten 12-56 seconden, gemiddeld 25 seconden en voor de bladluizen die geen virus overbrachten 12-58 seconden, gemiddeld 44 seconden.

TABEL 25. Virusoverbrenging door *Myzus persicae* uit met een scheermesje afgesneden stukjes epidermis van een met lupinemozaïekvirus besmet tuinboonblad.

TABLE 25. *Virustransmission by Myzus persicae from pieces of epidermis cut with the aid of a razor blade from a leaf of broadbean infected with lupin mosaic virus.*

Plaats waar de luizen zogen *Place of feeding of the aphids*	Verkregen overbrenging *Transmission obtained*	
Epidermis met sponsparenchym eronder *Epidermis with part of spongy parenchyma*	8/20 = 40%	12/23 = 52%
Doorzichtige epidermis *Clean epidermis*	5/22 = 23%	8/23 = 35%

Deze cijfers (tabel 25) wijzen enigszins in de richting, dat de aanwezigheid van het sponsparenchym onder de epidermis een gunstige invloed uitoefent op de virusoverbrenging. Van een werkelijk slechte overbrenging uit uitsluitend epidermis is hier echter geen sprake, hetgeen wij wel bij de proeven met afgetrokken epidermis constateerden.

Een sterke mechanische beschadiging kan verkregen worden, indien men het blad flink met carborundum wrijft. Dit deden wij tweemaal achtereen met blad van *Nicotiana glutinosa*, besmet met stoppelknolvirus. Voor en na de behandeling konden bladluizen gedurende 15 sec. op het blad zuigen, waarna zij op vier bladstukken van White Burley tabak werden geplaatst.

TABEL 26. Virusoverbrenging door 4 × 10 *Myzus persicae* uit blad van *Nicotiana glutinosa* besmet met stoppelknolvirus. Het blad was al of niet ingewreven met carborundum.

TABLE 26. *Virus transmission by 4 × 10 Myzus persicae from a leaf of Nicotiana glutinosa infected with cabbage blackring virus that was left untreated or had been rubbed with carborundum.*

Behandeling *Treatment*	Lokale vlekjes op White Burley tabak *Local lesions on White Burley tobacco*
Onbehandeld blad; *untreated leaf*	2 + 4 + 7 + 6 = 19
Met carborundum behandeld blad; *Rubbed leaf*	3 + 6 + 8 + 6 = 23

Van een invloed van het wrijven met carborundum op de overbrenging van het virus door een bladluis is hier geen sprake (tabel 26).

Bezien wij deze proeven in het licht van de plasmodesmentheorie van LAMBERTZ, die wij in de aanvang van dit hoofdstuk bespraken, dan zouden deze proeven niet met zijn bevindingen overeenstemmen. Hoe dunner de coupe, hoe sterker de kans op beschadiging van de betrokken cellen en des te meer plasmodesmen zouden zich moeten terugtrekken (tabel 25). LAMBERTZ neemt daarom betrekkelijk grote bladstukken, minstens 2 mm in diameter, daar hij anders geen plasmodesmen kan aantonen. Een bladluis is echter zeer goed in staat om virus uit dergelijke dunne coupes over te brengen. Tengevolge van een mechanische prikkeling zouden de plasmodesmen zich eveneens terugtrekken.

Volgens LAMBERTZ zouden bij ingrepen, zoals wij die verrichten, de plasmodesmen teruggetrokken moeten zijn. Maar op de virusopname had het kneuzen of het op andere wijze mechanisch beschadigen van epidermiscellen geen aantoonbaar nadelige invloed. Dit zou kunnen suggereren, dat de plasmodesmen voor het opnemen en het transport van virus geen doorslaggevende rol spelen. Wij hebben met de volgende proeven geprobeerd dit nader te toetsen.

7. INVLOED VAN HET DAGLICHT OP DE VIRUSOVERBRENGING

Aanleiding om de invloed van het daglicht op de virusoverbrenging na te gaan was een waarneming van LAMBERTZ (1954). Hij vond een duidelijk dagelijks ritme in het aantal plasmodesmen, dat in de celwand aanwezig is. Overdag kon hij weinig, maar 's nachts veel plasmodesmen in de celwanden aantonen. BAWDEN & ROBERTS (1947 en 1948) hadden reeds gevonden, dat een periode van duisternis of verminderde belichting, voorafgaande aan de mechanische inoculatie, de gevoeligheid van de toetsplant voor het virus verhoogt. Ook BRADLEY (1952) bevestigde dit voor de mechanische overbrenging van „*Datura wilt virus*" op bladeren van *Nicotiana rustica*. BRADLEY ging tevens na of een bladluis na een periode van duisternis van de toetsplant het virus al of niet beter in de plant kon brengen. Het blad met virussymptomen had hier geen periode van duisternis doorgemaakt, wél de toetsplant. Bij de proeven van deze auteur was zowel het percentage bladluizen, dat virus overbracht, als het aantal lokale vlekjes, dat per bladluis gevormd werd, gelijk voor de toetsplanten, onverschillig of deze al of niet een voorafgaande periode van duisternis hadden doorgemaakt. Wij konden geen gegevens in de literatuur vinden over de invloed van belichting op de virusopname door de bladluizen.

Indien de plasmodesmen een rol spelen bij het virustransport van cel tot cel en een bladluis in de celwand zijn stiletten met virus besmet, is het zeer goed mogelijk, dat een periode van licht remmend werkt op de virusopname door een bladluis. Na een periode van duisternis zou de kans op virusopname volgens deze redenering moeten toenemen. Om dit na te gaan hebben wij twee gelijke tuinboonblaadjes, die symptomen van lupinemozaïekvirus vertoonden in twee petrischalen gelegd. Beide schalen werden nu gedurende 20 uur in een lichtbak geplaatst onder continue belichting met T.L.-buizen. Een van de schalen was echter tevoren omwikkeld met zwart papier. *Myzus persicae*, die een vasttijd hadden doorgemaakt, mochten daarna gecontroleerd 15 sec. op deze blaadjes zuigen, waarna ze op een gezonde tuinboonplant werden geplaatst. De bladeren werden uit de petrischalen genomen vlak voordat de bladluizen erop gezet werden, die daarna slechts 15 sec. mochten zuigen. Op deze wijze werd verhinderd, dat de bladeren uit de verduisterde schaal toch gedurende lange tijd werden belicht.

Van een verschil tussen beide objecten (tabel 27) is hier geen sprake. Wij hebben terloops evenals BRADLEY nog nagegaan hoe het effect zou zijn, indien niet het zieke blad, maar de toetsplant in het licht onder T.L.-buizen of in het donker werd geplaatst. De planten bleven 20 uur in het licht of in het donker, alvorens de luizen erop geplaatst werden. Hierna zetten wij ze nogmaals gedurende 24 uur in het licht of donker terug, voordat wij de luizen doodden en de planten naar de kas overbrachten.

Tabel 27. Invloed van de belichting op de overbrenging van lupinemozaïekvirus uit tuinboon op tuinboon door *Myzus persicae.* Infectiebron 20 uur in licht of donker.

Table 27. *Influence of illumination on the transmission of lupin mosaic virus from broadbean to broadbean by Myzus persicae. Source of infection was kept in the light or in the dark for 20 h.*

	Ziek blad 20 uur in licht *Infected leaf in the light for 20 h.*	Ziek blad 20 uur in donker *Infected leaf in the dark for 20 h.*
1 luis per plant *1 aphid per plant*	13/35	18/35
„	8/21	12/21
„	20/20	17/19
2 luizen per plant *2 aphids per plant*	14/20	12/20

Tabel 28. Als tabel 27, maar toetsplant 20 uur in licht of donker.

Table 28. *As in table 27, but test-plant in the light or in the dark for 20 h.*

	Toetsplant in licht *Test plant in the light*	Toetsplant in donker *Test plant in the dark*
2 luizen per plant *2 aphids per plant*	14/20	12/20
3 luizen per plant *3 aphids per plant*	7/15	7/14

Uit deze proef (tabel 28) blijkt, dat al of niet belichten van de plant geen invloed heeft op de mate, waarin tuinboon door *Myzus persicae* met lupinemozaïekvirus wordt besmet. De resultaten stemmen dus overeen met wat Bradley voor de overbrenging van „*Datura wilt virus*" door *Myzus persicae* vond.

8. INVLOED VAN PLASMOLYSE EN DEPLASMOLYSE OP DE VIRUSOVERBRENGING

Zoals vermeld werd in hoofdstuk VI pag. 33, constateerde Lambertz, dat de plasmodesmen zich als gevolg van plasmolyse terugtrekken. Na deplasmolyse keert dit proces niet om, maar worden de laatste plasmodesmen, die na plasmolyse nog waren aan te tonen ook nog uit de celwanden teruggetrokken. Deze vondst maakt het bijzonder aantrekkelijk om zowel de mechanische virusoverbrenging als de biologische na te gaan in geplasmolyseerde en gedeplasmolyseerde bladeren; vooral ook omdat volgens Lambertz de plasmodesmen zich eerst na verloop van enkele dagen herstellen.

A. OPNAME VAN VIRUS DOOR MYZUS PERSICAE UIT GEPLASMOLYSEERDE OF GEDEPLASMOLYSEERDE BLADEREN

Om na te gaan of bladluizen uit geplasmolyseerde en gedeplasmolyseerde bladeren nog virus kunnen opnemen, werden allereerst proeven met het stoppelknolvirus genomen. De werkwijze was als volgt: Op bladeren van *Nicotiana glutinosa*, die systemische symptomen van het virus vertoonden, mochten 20 *Myzus persicae*, die vooraf gevast hadden, gedurende 15 sec. zuigen. Hierna werd hun virusoverbrengend vermogen nagegaan op twee bladeren van White Burley tabak. Op ieder blad werden 10 bladluizen geplaatst. Hetzelfde zieke blad werd hierna in 20% glucoseoplossing gedurende een half uur geplasmolyseerd. Dit geschiedde onder vacuüm met behulp van een waterstraalluchtpomp, die met een kraan op een exsiccator was aangesloten. Het zieke *Nicotiana glutinosa* blad werd daartoe in een bekerglas van 100 ml geplaatst, waarin zich een oplossing van 20% glucose bevond. Met behulp van glaskralen werd het blad onder het vloeistofoppervlak gehouden. Na afvloeien van het geplasmolyseerde blad, mochten ook hierop gedurende 15 sec. 20 *Myzus persicae* zuigen, die weer op twee bladeren van White Burley tabak werden geplaatst.De graad van plasmolyse werd nagegaan aan de hand van de turgescentie, alsook door microscopische controle van de toestand van de protoplast. Deplasmolyse werd uitgevoerd door een blad, dat volgezogen was met 20% glucoseoplossing, na afspoelen gedurende een half uur in een bekerglas van 100 ml met gedestilleerd water te plaatsen en ook dit onder vacuüm te brengen. Hierbij dient te worden opgemerkt, dat de hoeveelheid mogelijk in dit blad aanwezige glucoseoplossing niet meer bedroeg dan 2,5% van de hoeveelheid gedestilleerd water, zodat de eindconcentratie bij homogene verdeling der glucose niet meer dan 5 g glucose per liter zou bedragen. Op het gedeplasmolyseerde blad werden weer 20 *Myzus persicae* geplaatst.

TABEL 29. Invloed van plasmolyse en deplasmolyse van een met stoppelknolvirus besmet blad van *Nicotiana glutinosa* op de virusoverbrenging door *Myzus persicae* op twee bladeren White Burley tabak.

TABLE 29. *Influence of plasmolysis or deplasmolysis of a leaf of Nicotiana glutinosa infected with cabbage blackring virus on the transmission by Myzus persicae.*

Behandeling van infectiebron *Treatment of infected leaf*	Aantal lokale vlekjes op toetsblad *Number of local lesions on test leaf*
a) Onbehandeld ziek blad *Infected, untreated leaf*	16 + 8
b) Idem, na ½ uur plasmolyse in glucose 20% *The same, after plasmolysis in 20% glucose*	4 + 13
c) Idem, na deplasmolyse ½ uur in water *The same, after deplasmolysis*	9 + 11
d) Idem, na een tweede plasmolyse in 20% glucose *The same, after a second plasmolysis in 20% glucose*	3 + 15

Uit tabel 29 blijkt dus, dat *Myzus persicae* stoppelknolvirus even goed overbrengt uit bladeren, die in 20% glucose zijn geplasmolyseerd, als uit onbehandelde of gedeplasmolyseerde bladeren. Deze proef werd in een iets gewijzigde vorm herhaald met weer 2 x 10 bladluizen en een zuigtijd van 15 sec. De behandeling geschiedde weer met behulp van een waterstraalluchtpomp en een exsiccator, ditmaal met verschillende glucose-concentraties.

TABEL 30. Proef als vorige.
TABLE 30. *Experiment like the preceding one.*

Behandeling van infectiebron *Treatment of infected leaf*	Aantal lokale vlekjes op toetsblad *Number of local lesions on test leaf*
a) Onbehandeld ziek blad *Untreated leaf*	10 + 8
b) Na ½ uur plasmolyse in 20% glucose *After plasmolysis in 20% glucose for ½ h.*	9 + 16
c) Na een tweede plasmolyse gedurende 5/4 uur in 40% glucose *After a second plasmolysis of 5/4 h. in 40% glucose*	6 + 8
d) Na een derde plasmolyse gedurende ½ uur in 60% glucose *After a third plasmolysis in 60% glucose for ½ h.*	1 + 6
e) Na 1½ uur deplasmolyse *After deplasmolysis for 1½ h.*	1 + 1

Bij deze proef (tabel 30) is onmiskenbaar van een verminderde overbrenging sprake bij object e en in mindere mate bij object d. Het blijkt, dat bij plasmolyse in een zeer geconcentreerde stroperige glucoseoplossing virusopname door een bladluis zeer wordt bemoeilijkt, terwijl bovendien ook na deplasmolyse deze toestand wat betreft de mogelijkheid van virusopname niet terstond hersteld wordt, ook al werden de bladeren geheel turgescent.

Indien er een correlatie bestond tussen het terugtrekken van de plasmodesmen en de virusoverdracht door een bladluis, dan zou dit al bij de eerste behandeling (b) voor de dag hebben moeten komen. Hiervoor bestaat echter niet de minste aanwijzing. Het is ons niet duidelijk, waarom bij hoog geconcentreerde glucoseoplossingen virusopname bemoeilijkt wordt. In ieder geval kan hier geen sprake zijn van enzymatische inactivering daar de protoplasten intact bleven. Wij gingen niet na of het blad blijvende schade had ondervonden van de behandeling met een geconcentreerde glucoseoplossing.

In ieder geval blijkt, dat een bladluis in staat is virus op te nemen uit zieke bladeren, die in een glucoseoplossing van 20% en sterker geplasmolyseerd en later gedeplasmolyseerd waren.

B. INFECTIE DOOR MYZUS PERSICAE VAN GEPLASMOLYSEERDE EN GEDEPLASMOLYSEERDE BLADEREN

Volledigheidshalve werd ook onderzocht of een bladluis virus, dat zij uit een ziek blad heeft opgenomen, in een geplasmolyseerd of gedeplasmolyseerd gezond blad kan overbrengen. Een moeilijkheid, die wij hierbij ontmoetten, was, dat op geplasmolyseerde en gedeplasmolyseerde bladeren geen lokale vlekjes gevormd werden, zodat de mate van virusoverdracht niet was te beoordelen aan de hand van het aantal vlekjes. In deze bladeren waren de intercellulaire ruimten geheel opgevuld met water. Mogelijk verhindert het ontbreken van zuurstof op de plaats van de virusvermeerdering de vorming van donkergekleurde reactieprodukten. De mate van virusoverdracht werd nu bepaald door de gedeplasmolyseerde bladeren in hun geheel na drie dagen op hun virusgehalte te toetsen door uitstrijk op onbehandelde gezonde bladeren, zoals wij altijd deden bij de later te bespreken proeven met mechanische overbrenging.

Aanvankelijk meenden wij ook op gedeplasmolyseerd blad duidelijk lokale vlekjes te verkrijgen, maar deze vertoonden een verre van normaal uiterlijk, zodat wij er nimmer zeker van waren werkelijk met virussymptomen te doen te hebben. Wij hebben derhalve verdacht uitziende vlekjes uitgeponst en getoetst op virusgehalte door ze met carborundum op onbehandeld gezond blad uit te strijken. Uit de gebrekkige resultaten hiermede verkregen, kunnen wij slechts concluderen, dat wij niet steeds met de gebruikelijke lokale vlekjes te doen hadden.

TABEL 31. Overbrenging van het stoppelknolvirus uit ziek blad van *Nicotiana glutinosa* op een geplasmolyseerd of gedeplasmolyseerd gezond blad van White Burley tabak door *Myzus persicae.*

TABLE 31. *Transmission of cabbage blackring virus by Myzus persicae from an infected leaf of Nicotiana glutinosa to healthy leaves of White Burley tobacco, that were plasmolysed or deplasmolysed.*

Behandeling *Treatment*	Aantal lokale vlekjes op blad van White Burley tabak, ontstaan na overtoetsing van blad waarop 10 *Myzus persicae* zogen *Number of local lesions formed on White Burley tobacco after inoculation with sap from leaves of White Burley on which 10 Myzus persicae had fed. On plasmolysed or deplasmolysed leaves no distinct local lesions developed, therefore these test leaves had to be tested on infection by inoculating sap from them with carborundum on other White Burley leaves*					
	1e proef	*1st trial*	2e proef	*2nd trial*	3e proef	*3rd trial*
Controle, *control*	3	3	15	14	5	6
Geplasmolyseerd blad in 20% glucose *Plasmolysed leaf in 20% glucose*	2	4	1	0	2	0
Gedeplasmolyseerd blad *Deplasmolysed leaf*	0	0	3	5	1	0

Indien de bladluizen op geplasmolyseerd blad werden geplaatst, werden ze een uur later verwijderd en het blad op filtreerpapier en water in een petrischaal weggezet, waarna deplasmolyse plaatsvond. Vervolgens verbleven de bladluizen gedurende 24 uur op gedeplasmolyseerd blad.

Geplasmolyseerde en gedeplasmolyseerde bladeren kunnen dus door de bladluis worden geïnfecteerd (tabel 31). Wel krijgen wij de indruk, dat dit veel minder gemakkelijk geschiedt dan bij onbehandelde bladeren.

C. DIEPTE VAN DE WOND, DIE DOOR WRIJVEN MET CARBORUNDUM ONTSTAAT

Om rechtstreeks de diepte te kunnen vaststellen van de verwonding, die wrijven met carborundum op de cuticula veroorzaakt, hebben wij replica's gemaakt van de cuticula voor onderzoek met de elektronenmicroscoop. Nadat het blad met carborundum was bestreken, werd het afgespoeld met water en met plakband op een glasplaatje bevestigd. Hierna werden op het blad enkele druppels van een 8% oplossing van bedacryl in xylol verspreid. Na het opdrogen van de vloeistof werd dit enige malen herhaald. Na overstaan gedurende een nacht werd het vliesje aan de randen losgesneden en sprong het meestal los van het blad. Hierna werd het vliesje omgekeerd op de elektrode van een gasontladingsvaatje geplaatst en een koolvlies op het replica afgezet. Dit samengestelde vliesje werd op een preparaathouder gelegd met de koollaag naar beneden en met behulp van xylol werd de bedacryl weer opgelost. Het koolvlies, dat nu overbleef en een copie is van het bladoppervlak, werd rechtstreeks bekeken. Betrekkelijk weinig krassen kwamen hierop voor, terwijl de randen van de krassen weer waren dichtgeklapt. De breedte van de krassen was nogal verschillend. Vaak waren zij $\pm$ 5 μ breed (foto's 18 en 19). Echter werden ook veel grotere verwondingen op de epidermis waargenomen. De breedte geeft enig denkbeeld van de mogelijke diepte van de kras, maar deze is niet rechtstreeks te bepalen. Indien wij aannemen, dat het uitsteeksel van het stukje carborundum, dat een kras van 6 μ breedte veroorzaakte, tophoeken heeft van 90°, dan bedraagt de bereikbare diepte van de kras 3 μ. In dit geval is bij een tuinboon de cuticula zeker doorboord. Al weten wij nu iets over de diepte van de carborundumverwondingen, toch blijft het een onopgeloste vraag, welke van de vele verwondingen bij inoculatie uiteindelijk in een infectie zal resulteren. Rest ons nog de eigenaardige rimpelstructuur van de cuticula te bespreken. De plooien op foto 18, die rond het huidmondje te vinden zijn, zijn de natuurlijke plooien van de cuticula, vooral bij huidmondjes van tuinboon. De rimpelstructuur, die over het hele preparaat voorkomt, wordt waarschijnlijk door contractie van het bedacrylvliesje veroorzaakt en is dus een artefact.

D. SAPINOCULATIE VAN GEPLASMOLYSEERDE EN GEDEPLASMOLYSEERDE BLADEREN

Na onze ervaringen met overbrenging van virus door bladluizen uit en in geplasmolyseerd en gedeplasmolyseerd weefsel, leek het ons gewenst na te gaan in hoeverre plasmolyse en deplasmolyse de mechanische overbrenging van virus beïnvloeden. De proefopzet was als volgt. Gewerkt werd met bladeren van *Nicotiana glutinosa*, die onder de waterstraalpomp gedurende een half uur met verschillende concentraties glucose behandeld werden. Deze bladeren werden gehalveerd, de ene helft werd afgespoeld, met filtreerpapier afgedroogd en nadat op het blad carborundum was gestrooid, met een penseel geïnoculeerd met T.M.V. De andere bladhelften werden na het afspoelen van suiker ontdaan door ze gedurende een half uur in water onder de waterstraalluchtpomp te plaatsen, waarna ze geïnoculeerd werden met T.M.V. De behandelde bladeren werden alle op vochtig filtreerpapier in een petrischaal gelegd. Per object werden 5 bladhelften gebruikt. Alle bladhelften werden na drie dagen fijngewreven. Het virusgehalte werd getoetst op vijf nieuwe bladhelften van *Nicotiana glutinosa.*

TABEL 32. Invloed van plasmolyse en deplasmolyse van bladeren van *Nicotiana glutinosa* op de vermeerdering van T.M.V.

TABLE 32. *Influence of plasmolysing or deplasmolysing leaves of Nicotiana glutinosa on the multiplication of T.M.V.*

Behandeling van het toetsblad *Treatment of the test leaf*	Aantal lokale vlekjes op 5 *Nicotiana glutinosa* bladeren *Number of local lesions on 5 leaves of Nicotiana glutinosa*
a) Controle, *untreated*	250
b) Na ½ uur onder waterstraalluchtpomp in water *After ½ h. in water under vacuum*	235
c) Na 2e maal in water onder waterstraalluchtpomp *After a 2nd time in water under vacuum*	271
d) Na ½ uur in 5% glucose onder waterstraalluchtpomp *After ½ h. in 5% glucose under vacuum*	83
e) Idem, na deplasmolyse *The same, after deplasmolysis*	291
f) Na ½ uur in 10% glucose onder waterstraalluchtpomp *After ½ h. in 10% glucose under vacuum*	0
g) Idem, na deplasmolyse *The same, after deplasmolysis*	217
h) Na ½ uur in 20% glucose onder waterstraalluchtpomp *After ½ h. in 20% glucose under vacuum*	0
i) Idem, na deplasmolyse *The same, after deplasmolysis*	274

Daar het, zoals reeds eerder beschreven, niet mogelijk was op het geplasmolyseerde en het gedeplasmolyseerde blad lokale vlekjes met zekerheid vast te stellen, is ons niet bekend hoeveel virusdeeltjes werkelijk infectie veroorzaakten. Derhalve is niet met zekerheid na te gaan of de uiteindelijk gevonden verschillen in virusconcentratie in de behandelde bladeren moeten worden toegeschreven aan een minder geslaagde inoculatie dan wel aan het uitblijven van virusvermeerdering, althans bij object d (tabel 32). Het toetsen van de objecten f en h toont aan, dat hier beslist geen virusvermeerdering heeft plaatsgevonden. Na plasmolyse in 10% suiker heeft dus geen virusvermeerdering meer plaats. Plasmolyse heeft geen blijvend nadelige invloed op de virusvermeerdering, daar na deplasmolyse in alle bladeren de virusvermeerdering normaal verloopt.

Legt men gedeplasmolyseerde bladeren niet op water, maar op een suikeroplossing, dan heeft geen virusvermeerdering plaats. De intercellulairen zijn nog gevuld met water en de suiker diffundeert zonder moeite in het blad en veroorzaakt plasmolyse. Uit deze proeven blijkt, dat wél virusinfectie plaats vindt maar geen vermeerdering, indien men de gegevens vermeld in tabel 32 sub f tot en met i beschouwt. Wordt dus een blad na inbrengen van virus geplasmolyseerd, dan wordt vermeerdering van de binnengedrongen virusdeeltjes verhinderd.

Indien men onbehandelde *Nicotiana glutinosa* bladeren eerst met T.M.V. inoculeert en daarna onder normale druk op een glucose-oplossing laat drijven, vindt normale virusvermeerdering plaats, vrijwel onafhankelijk van de gebruikte glucose-oplossing (tabel 33). Het blad blijft hierbij namelijk volkomen turgescent.

TABEL 33. Aantal lokale vlekjes, gevormd na inoculatie met T.M.V. op vier bladeren van *Nicotiana glutinosa*, die daarna op 0, 5, 10 en 20% glucose oplossing werden gelegd.

TABLE 33. *Number of local lesions formed on four leaves of Nicotiana glutinosa, when inoculated leaves were floated on a solution of 0, 5, 10 and 20% of glucose.*

De geïnoculeerde bladeren dreven op: *The inoculated leaves floated on:*	Aantal lokale vlekjes *Number of local lesions*
Water	75
5% glucose	84
10% glucose	90
20% glucose	63

In aansluiting bij het voorgaande leek het ons nodig een virus te onderzoeken, dat zowel mechanisch als door bladluizen kan worden overgebracht. Wij gebruikten hiertoe het stoppelknolvirus en bladeren van White Burley tabak, waarop met behulp van carborundum het inoculum werd aangebracht. De behandelde bladeren werden vervolgens na drie dagen weer getoetst op virusgehalte op een tweede serie bladeren van White Burley tabak.

TABEL 34. Invloed van plasmolyse en deplasmolyse van bladeren van White Burley tabak op de mate van infectie met het stoppelknolvirus.

TABLE 34. *Influence of plasmolysing and deplasmolysing test leaves of White Burley tobacco on the transmission of cabbage blackring virus.*

Behandeling *Treatment*	Totaal aantal lokale vlekjes *Total number of local lesions*
a) Controle, *untreated*	50
b) Na ½ uur onder waterstraalluchtpomp in water *After ½ h. in water under vacuum*	68
c) Na ½ uur onder waterstraalluchtpomp in 5% glucose *After ½ h. in 5% glucose under vacuum*	4
d) Idem, na deplasmolyse *The same, after deplasmolysis*	63
e) Na ½ uur onder waterstraalluchtpomp in 10% glucose *After ½ h. in 10% glucose under vacuum*	7
f) Idem, na deplasmolyse *The same, after deplasmolysis*	22
g) Na ½ uur onder waterstraalluchtpomp in 20% glucose *After ½ h. in 20% glucose under vacuum*	9
h) Idem, na deplasmolyse *The same, after deplasmolysis*	6

Het effekt, dat door plasmolyse en deplasmolyse bij T.M.V. werd verkregen, komt in grote lijnen overeen met wat wij hier bij het S.K.V. zien. Alleen blijkt (tabel 34), dat bij hogere concentraties glucose het proces steeds minder reversibel wordt dan bij T.M.V. met *Nicotiana glutinosa* als toetsplant. Het is mogelijk, dat de deplasmolyse bij White Burley tabak niet zo snel geschiedt en ook de plasmolyse zelfs bij 20% glucose nog niet totaal is geweest (vergelijk tabel 31). Zelfs bij hoge glucoseconcentraties vond virusvermeerdering plaats, zij het in zeer geringe mate, terwijl de deplasmolyse, zoals wij die uitvoerden, het blad niet teruggebracht tot de normale gevoeligheid voor infectie met dit virus.

Een blad, dat in geplasmolyseerde toestand werd geïnoculeerd, werd in alle gevallen na de behandeling weer gedeplasmolyseerd bij het laten drijven op water. Indien dus geen virusvermeerdering werd geconstateerd, menen wij te mogen aannemen, dat de poging tot infectie geen succes heeft gehad en dat ook geen besmetting is opgetreden, daar zoals wij aantoonden het plasmolyse-proces op zichzelf geen nadelige werking op de virusvermeerdering heeft. Dit laatste blijkt althans bij *Nicotiana glutinosa* uit het verloop van de infectie na deplasmolyse. Wij menen dus te moeten concluderen, dat in het geval van *Nicotiana glutinosa* en T.M.V., sterk geplasmolyseerd weefsel niet meer geïnfecteerd kan worden.

Deplasmolyse verloopt veel minder snel, indien men geplasmolyseerde bladeren na afvloeien laat drijven op water, dan indien men het proces onder water in vacuüm uitvoert. Om na te gaan na hoeveel tijd de geplasmolyseerde cellen weer geïnfecteerd kunnen worden, hebben wij de geplasmolyseerde bladeren niet snel met behulp van een waterstraalluchtpomp gedeplasmolyseerd, maar in langzaam tempo, door de geplasmolyseerde bladeren op water te laten drijven. Voor deze proef werden 24 bladeren van *Nicotiana glutinosa* in 20% glucose gedurende een half uur onder de waterstraalluchtpomp geplasmolyseerd. Hierna spoelden wij ze met water af en droogden ze tussen vellen filtreerpapier. Indien dit laatste niet geschiedde, bleven de bladeren niet drijven op water doordat de bovenkant vochtig bleef. Naast drie onbehandelde controlebladeren inoculeerden wij nu drie geplasmolyseerde bladeren. De andere geplasmolyseerde bladeren lieten wij gedurende verschillende tijden op water drijven, waarna wij deze eveneens met een penseel met T.M.V. inoculeerden. Alle bladeren werden na drie dagen fijngewreven en hiermede werden vijf *Nicotiana glutinosa* bladeren geïnoculeerd.

TABEL 35. Infecteerbaarheid van geplasmolyseerde bladeren van *Nicotiana glutinosa,* nadat deze gedurende verschillende tijden op water hebben gedreven.

TABLE 35. *Times during which plasmolysed leaves of Nicotiana glutinosa had to float on water before they could be infected again with T.M.V.*

Tijd, dat de geplasmolyseerde bladeren op water drijven *Floating time of plasmolysed leaves on water*	Aantal lokale vlekjes per blad *Number of local lesions*					Totaal *Total*
Controle, *control*	181	54	82	118	70	505
0 min.	0	0	0	0	0	0
10 „	2	1	0	0	0	3
20 „	1	0	0	0	0	1
30 „	12	3	0	2	2	19
60 „	16	9	10	7	13	55
120 „	70	48	25	39	33	215
180 „	27	39	100	87	72	331
240 „	207	166	88			600 (× 5/3)

Het herstel van de mogelijkheid tot infectie vindt dus snel plaats (tabel 35). Na vier uur drijven op water zijn de geplasmolyseerde blaadjes weer even goed te infecteren als de onbehandelde. Met behulp van een waterstraalluchtpomp wordt dit echter binnen een half uur reeds bereikt (zie resultaten tabel 32).

Wij wilden graag weten of de protoplast voor het aanslaan van een inoculatie werkelijk verwond moet worden. Om dit te onderzoeken gingen wij als volgt te werk: Bladeren werden geplasmolyseerd, afgespoeld, afgedroogd en hierna werd de buitenwand van de epidermis opengemaakt door wrijven met een penseel met carborundum. Daarna lieten wij de

bladeren op water drijven om de protoplasten weer te laten zwellen. Dit proces was na ongeveer 2 uur flink op gang (zie de resultaten in tabel 35). Er waren toen intacte protoplasten in verwonde epidermiscellen. Wanneer nu de bladeren in een T.M.V.-oplossing werden gedompeld zou geen besmetting mogen plaatsvinden, indien hiervoor verwonding van de protoplast nodig is.

Het blijkt echter uit de volgende tabel, dat een langer tijdsinterval tussen verwonding en inoculatie de infectiekans — ook bij niet geplasmolyseerde bladeren — doet afnemen. Voor ieder object werden 2 x 5 bladhelften van *Nicotiana glutinosa* verwond door met een penseel carborundum over de bladeren te wrijven. Direct na deze behandeling, of na verloop van enige tijd, werden deze bladeren in een T.M.V.-oplossing gedompeld.

TABEL 36. Invloed van de tijdsduur tussen verwonden en dompelen in een virusoplossing op de infectie met T.M.V. bij tien bladhelften van *Nicotiana glutinosa*.

TABLE 36. *The infection with T.M.V. of 10 leaf-halves of Nicotiana glutinosa by dipping them in a solution of this virus at different times after the leaf-halves were wounded with carborundum.*

Tijdsduur tussen verwonden en dompelen *Lapse of time between wounding and dipping*	Aantal lokale vlekjes *Number of local lesions*
0 min.	1164
2 „	237
5 „	195
15 „	223
30 „	184
60 „	52
180 „	22
360 „	0
720 „	0
1440 „	0

Reeds 2 min. na het krassen met carborundum vermindert de infectie met 80% ten opzichte van het onmiddellijk dompelen in een T.M.V.-oplossing (tabel 36). Na 30, 60 en 180 min. bedroegen de percentages resp. slechts 15, 5 en 2% van de controle. Uit de proef, samengevat in tabel 35, blijkt, dat 30 en 60 min. na het begin van de deplasmolyse de infectie resp. 4 en 10% bedraagt van die bij onbehandelde bladeren. In een proef (tabel 37), waarbij geplasmolyseerde bladeren verwond werden en vervolgens gedeplasmolyseerd, was 30 en 60 min. na het verwonden slechts een zeer geringe infectie te constateren tengevolge van dompeling in een T.M.V.-oplossing.

Voor de interpretatie van de proefresultaten is een nadere verklaring noodzakelijk. Met de tijd neemt volgens tabel 35 de infecteerbaarheid tengevolge van de voortschrijdende deplasmolysering toe, terwijl terzelfdertijd de infecteerbaarheid afneemt volgens de in tabel 36 beschreven proef,

TABEL 37. Combinatie van beide voorgaande proeven, dus geplasmolyseerde bladeren van *Nicotiana glutinosa* verwonden met carborundum en — nadat ze gedurende verschillende tijden op water hebben gedreven — in een T.M.V.-oplossing dompelen.

TABLE 37. *Combination of the two preceding trials. Plasmolysed leaves of Nicotiana glutinosa were wounded with carborundum and dipped in a T.M.V.-solution different times after they had floated on water.*

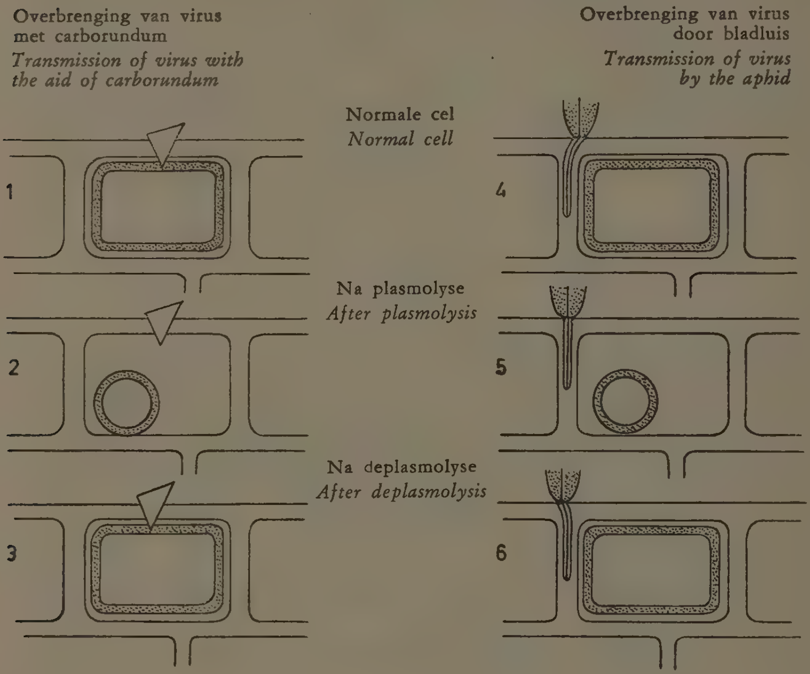
Tijdsduur tussen verwonden en dompelen *Lapse of time between wounding and dipping*	Aantal lokale vlekjes *Number of local lesions*
0 min.	0
10 „	0
20 „	0
30 „	1
60 „	2
120 „	0
240 „	0

naarmate meer tijd verlopen is tussen mechanisch beschadigen (met behulp van carborundum) van het — niet geplasmolyseerde — blad en het moment, waarop virus wordt aangebracht. Er is dan slechts een korte termijn denkbaar gedurende welke het blad zou zijn te infecteren en tabel 37 toont inderdaad aan, dat het blad op een bepaald moment wel infecteerbaar is, maar daarvoor en daarna niet. Indien men aanneemt, dat evenals in andere proeven, het aantal lokale vlekjes veroorzaakt door sap van onbehandelde bladeren van de grootte-orde van 500 — 1000 zou zijn geweest, dan zou na 30 min. op grond van de gegevens van de tabellen 35 en 36 ongeveer $^1/_2$% van 500 — 1000, dus 2 — 5 moeten zijn. Dit aantal stemt overeen met wat wij vonden, hoewel het gevaarlijk is, uit zulke kleine getallen conclusies te trekken.

Het is thans noodzakelijk de resultaten van de voorafgaande proeven tezamen te beschouwen. Men heeft zich mechanische infectie wel als volgt voorgesteld:
Door het carborundum wordt de celwand opengemaakt, waardoor het daaronder liggende protoplasma, waarop zich de „virusreceptoren" zouden bevinden, bereikbaar wordt voor het virus. Uit onze proeven blijkt, dat deze voorstelling te sterk vereenvoudigd is. Geplasmolyseerde cellen blijken zeer moeilijk of niet infecteerbaar te zijn, hoewel men mag aannemen, dat ook hierbij de celwand bij het aanwenden van carborundum doorgekrast wordt. Virus zou dan de protoplast direct kunnen bereiken. Het zeer geringe aantal geslaagde infecties wijst erop, dat het virus toch slechts zelden aanslaat. Bouwt men voort op de gebruikelijke beschouwingswijze omtrent mechanische inoculatie, dan eist verklaring van het verschil in besmetbaarheid met of zonder plasmolyse de veronderstelling, dat de protoplast niet alleen moet worden blootgelegd, maar dat ze ook moet worden geraakt; bij geplasmolyseerde cellen, waar het plasma niet meer tegen de celwand aanligt, zal dit moeilijker worden. Dit hebben wij schematisch weergegeven in fig. 8. Dat plasmodesmen een ingangspoort

SCHEMATISCH OVERZICHT VAN DE OVERBRENGING VAN VIRUS LANGS MECHANISCHE WEG EN DOOR MIDDEL VAN BLADLUIZEN

A schematic comparison of virus transmission by mechanical means and by aphids



Tekening 8

Infectie met behulp van carborundum is alleen mogelijk, indien de buitenwand van het protoplasma te verwonden is (1 en 3). Is dit tengevolge van plasmolyse (2) niet mogelijk, dan is de cel ook niet te inoculeren.
De overbrenging van het virus geschiedt door de bladluis niet in het protoplasma, maar in de celwand. De infectie heeft dan ook zowel bij geplasmolyseerde als bij gedeplasmolyseerde cellen plaats.

Fig. 8

Infection with the aid of carborundum is only possible if the ectoplasm can be wounded (1 and 3). If this is impossible as a result of plasmolysis (2) infection does not occur. The aphid transmits virus into the cell wall. Therefore infection of plasmolysed cells by aphids (5) is possible.

voor het virus zouden zijn, is in zijn algemeenheid ook niet aanvaardbaar. Volgens Lambertz keren na deplasmolyse de plasmodesmen niet spoedig terug, dit zou dagen duren. Toch blijkt terstond na deplasmolyse het blad weer normaal infecteerbaar te zijn, tenminste bij *Nicotiana glutinosa* en T.M.V. Bij *Nicotiana tabacum* var. White Burley is ook na deplasmolyse een vermindering van de infecteerbaarheid aanwezig. Misschien is T.M.V. niet zonder meer vergelijkbaar met andere mechanisch over te brengen virussen. Tabel 37 leert, dat, indien men geplasmolyseerd *Nicotiana glutinosa* blad met carborundum beschadigt, waarbij waarschijnlijk de protoplast niet geraakt wordt, toch besmetting met T.M.V. kan plaatsvinden, indien men de bladeren, waarvan vermoedelijk alleen de celwanden beschadigd zijn, vervolgens met virus in contact brengt. Een verklaring is hier moeilijk te geven en wij vermelden deze proeven vnl. om aan te tonen, dat de hierboven genoemde voorstelling van mechanische infectie aanvechtbaar is.

Beschouwen we thans evenwel de proeven met bladluizen, stoppelknolvirus en White Burley tabak dan stuiten wij terstond weer op een tegenstrijdigheid. Wij toonden aan, dat de bladluizen het virus uit de celwand opnemen en het in de celwand afgeven. Plasmolyseert men een ziek blad zeer sterk, dan blijkt dit nauwelijks invloed te hebben op het opnemen van het virus uit de celwand. Alleen de virusafgifte in een geplasmolyseerd en gedeplasmolyseerd blad blijkt sterk bemoeilijkt te worden. Wil men vasthouden aan de plasmodesmentheorie, dan zou men moeten aannemen, dat bij plasmolyse de plasmodesmen ten dele in de wand tussen twee cellen achterblijven, welke fragmenten niet in contact staan met de protoplast. Uit deze plasmadraadjes zou de bladluis misschien virus kunnen opnemen.

Ook bij het inbrengen van virus door de bladluis is contact met dergelijke plasmadraadjes denkbaar, maar men zou zich kunnen voorstellen, dat dit virus geïnactiveerd wordt, voordat enkele dagen later het verband tussen protoplast en plasmodesmen hersteld wordt. Zo zou dus wel virus in de plant worden gebracht zonder dat het tot vermeerdering komt. Neemt men deze theorie tot uitgangspunt, dan bestaat er een redelijke overeenstemming tussen het weliswaar geringe aantal geslaagde mechanische infecties na plasmolyse en deplasmolyse en het geringe aantal geslaagde besmettingen, dat door bladluizen na plasmolyse kan worden veroorzaakt. Lambertz schrijft nl., dat enkele plasmodesmen altijd intact blijven.

Het gedrag van T.M.V. in dit verband blijft evenwel onverklaarbaar, evenals het raadselachtig is, waarom dit uiterst infectieuze virus niet door bladluizen wordt overgebracht.

Over de aanwezigheid van plasmodesmenresten in de celwand is niets bekend, maar wij hebben getracht hierover enige gegevens te verkrijgen. Het bleek, dat de buitenepidermis van de bolrok van een ui — in tegenstelling tot de binnenepidermis, die zeer gemakkelijk los te scheuren is — zeer stevig aan het onderliggende weefsel verbonden is. Deze binding is zo sterk, dat de epidermis vaak niet in zijn geheel van de bolrok kan worden afgetrokken. Vaak kunnen alleen de buitenwanden van de epidermis wor-

den losgescheurd. Indien wij nu de bolrok gaan plasmolyseren, voordat wij de buitenwand eraf trekken, dan kunnen wij aannemen, dat de protoplasten los in de cellen liggen. Trekt men nu de genoemde epidermis af, dan vallen de protoplasten in hun geheel uit de opengescheurde cellen. Wij verkrijgen dus zo een epidermis, waaraan de binnenwanden bij het merendeel der cellen ontbreken. Onder een binoculair werden de stukjes epidermis beoordeeld op de aanwezigheid van protoplasten en stukjes, waarin deze voorkwamen, werden verwijderd. Nadere controle vond plaats onder de microscoop. Indien resten protoplasma in de celwand aanwezig zouden zijn na plasmolyse, zouden deze met een zeer gevoelige reactie op stikstof moeten zijn aan te tonen. De behandeling van de geprepareerde celwand was als volgt: Deze werd gesuspendeerd in 1 ml 6 n. HCl en gedurende 16 uur bij 100° C. op een waterbad geplaatst; daarna werd er drooggedampt. Het hydrolysaat kan aminozuren en NH_3 bevatten, die afkomstig zouden kunnen zijn van eventueel voorkomende eiwitten. Het gedroogde hydrolysaat werd opgenomen in 0,5 ml citraatbuffer (pH 5,0). Hierna werd 1 ml ninhydrine reagens toegevoegd (VENEKAMP, 1955 pag. 520) en het geheel gedurende 20 minuten op een waterbad tot kookpunt verhit. Met 4,5 ml n. propanol-water (1 : 1 v./v.) werd verdund en meting geschiedde in een Zeiss-spectrofotometer bij 570 mμ. Bij deze proef werd geen stikstof in de celwanden aangetoond, hetgeen suggereert, dat geen restanten van plasmodesmen aanwezig waren. Volgens mondelinge mededeling van VENEKAMP, die deze reactie voor ons verrichtte, zou de aanwezigheid van plasmodesmen zich stellig moeten hebben verraden door een blauwkleuring. De uitslag van deze proef maakt het achterblijven van plasmodesmenresten in wanden tussen twee cellen na plasmolyse althans bij ui minder waarschijnlijk.

HOOFDSTUK VII

RECAPITULATIE VAN DE VOORAFGAANDE PROEVEN

Wat kunnen wij nu uit de resultaten van deze proeven conluderen en kan op grond hiervan de slechte virusoverdracht door een bladluis uit een afgetrokken epidermis worden verklaard?

Uit onze proeven bleek het volgende:
Voor de besmetting van een bladluis met non-persistente virussen is, in tegenstelling tot het opnemen van voedsel, geen druk nodig. Dit bleek uit de virusopneming uit geplasmolyseerde bladeren. Bij verdergaande wateronttrekking aan het weefsel wordt het virus tenslotte niet langer opneembaar. Dit proces is echter omkeerbaar; het opnemen van virus door een bladluis kan door wateropneming van het weefsel weer worden hersteld. Het opnemen van virus door een bladluis is blijkbaar aan het leven van het planteweefsel gebonden. Door alle agentia, waardoor het blad wordt gedood, bijv. door warmte, koude of chemicaliën, wordt het virus voor een bladluis onopneembaar. Het is ons niet gelukt een bladluis virus te doen opnemen uit plantesap, behoudens één enkele uitzondering, waarbij een bladluis door een afgetrokken epidermis zoog van een gezonde tuinboonplant, waarboven zich een virusoplossing bevond. Het is onzeker, of de plasmodesmen bij het opnemen van virus uit de plant een rol spelen. Bij T.M.V. op *Nicotiana glutinosa* lijkt het zeer onwaarschijnlijk, dat ze bij het virustransport van belang zijn. Bij de overdracht door bladluizen en de mechanische overbrenging van stoppelknolvirus op White Burley kan men de plasmodesmen een rol toedenken, maar de verklaring van het proces onder beschouwing van het gedrag van de plasmodesmen wordt weer verzwakt door onze proeven met *Allium* epidermis. Het verminderend effect van het aftrekken van de epidermis van een met lupinemozaïekvirus besmet blad van tuinboon op de virusoverdracht door een bladluis, konden wij op geen enkele manier nabootsen. Hierbij moet wel worden bedacht, dat door het aftrekken de epidermiscellen geen ernstig letsel ondervinden. Met behulp van de fasecontrastmicroscoop stelden wij nl. plasmastroming vast in de cellen van de afgetrokken epidermis.

Een belangrijke vraag is hoe het virus uit de celwand in de protoplasten komt, waar uiteindelijk de virusvermeerdering plaats heeft.

Zoals JEENER & VAN RIJSSELBERGE (1955) aantoonden, wordt door virus (T.M.V.), dat via de stomata in de intercellulaire ruimten tussen de parenchymcellen gebracht wordt, geen infectie veroorzaakt. Uit onze proeven concludeerden wij, dat wellicht de buitenwand van de protoplast eerst verwond moet worden, wil het virus kunnen aanslaan. Deze bevindingen sluiten dus fraai op elkaar aan. Wij konden de resultaten van JEENER & VAN RIJSSELBERGE bevestigen in proeven, waarbij wij toetsbladeren onder vacuüm met stoppelknolvirus en T.M.V. impregneerden. Na enkele dagen kon in de geïmpregneerde bladeren meestal geen virus meer worden aangetoond. Volgens LAMBERTZ (1954) doorlopen plasmodesmen de celwanden

tot in de intercellulaire ruimten, waar ze niet — zoals bij de ectodesmen gebeurt — door een cuticula worden afgedekt. In bovengenoemde proeven zou het virus dus in contact moeten komen met de protoplasten van de omliggende cellen. De meest voor de hand liggende verklaring voor het uitblijven van activering zou nu zijn, dat de specifieke receptoren voor dit virus zich niet in de uitlopers van de protoplast bevinden, maar dieper liggen. Dit zou ook overeenstemmen met het mislukken van iedere poging om geplasmolyseerde bladeren van *Nicotiana glutinosa* te infecteren met T.M.V.

Hiertegenover staat, dat het stoppelknolvirus evenmin aanslaat, wanneer men dit in de intercellulairen brengt, terwijl wij zagen, dat de gedragingen van dit virus niet uitsluiten, dat de plasmodesmen bij de overbrenging een rol spelen. Enkele schijnbaar tegenstrijdige resultaten van onze proeven dienen nog nader te worden besproken.

1. Terwijl virus uit dood weefsel zeer gemakkelijk langs mechanische weg kan worden overgebracht, ja zelfs vaak beter dan uit niet van te voren gedood weefsel, gelukt het een bladluis niet virus uit dood weefsel op te nemen, al steken bladluizen hierin wel hun stiletten. De vraag, of een bladluis voedsel uit dood weefsel kan opnemen, kan hier buiten beschouwing worden gelaten.
2. Hoewel het opnemen en afgeven van virus door bladluizen uit levend weefsel na plasmolyse en deplasmolyse verklaard kan worden door het gedrag der plasmodesmen volgens LAMBERTZ en ook voor wat betreft het stoppelknolvirus de mechanische overbrenging hiermee in overeenstemming is, wijst de onmogelijkheid om een blad te infecteren via de intercellulaire ruimten erop, dat contact tussen virus en plasmodesmen niet zonder meer voldoende is om het virus te doen aanslaan. Wellicht is dit paradoxale gedrag van het virus te verklaren door de veronderstelling, dat het virus in twee vormen voorkomt.

Men mag op grond van onze kennis omtrent bacteriofagen en enkele virussen, die planten besmetten [*Turnip yellow mosaic virus:* MARKHAM, MATTHEWS & SMITH (1948), MARKHAM & SMITH (1949) en T.M.V.: HART (1955 a en b), FRAENKEL-CONRAT & WILLIAMS (1955), GIERER & SCHRAMM (1956), SCHUSTER, SCHRAMM & ZILLIG (1956)], wellicht aannemen, dat plantaardige virussen bestaan uit een mantel van proteïne en een kern van nucleïnezuur, het „actieve" bestanddeel van het virus. Wil het virus aanslaan, dan moet het actieve bestanddeel in contact komen met een daarvoor gevoelig deel van de protoplast. Wij weten van bacteriofagen, hoe deze zich aan de bacteriewand hechten, waarna het nucleïnezuur in de bacterie dringt. Het is verleidelijk aan te nemen, dat een dergelijk proces zich bij virusinfectie van een plant voordoet.

Men mag aannemen, dat te allen tijde in een zieke plant zowel vrije, actieve virusbestanddelen als complete, van een mantel voorziene virusdeeltjes voorkomen, anders dan bij een bacterie, waar het proces, uitgaande van een of meer infecterende fagen zo verloopt, dat op een gegeven moment alleen actieve bestanddelen aanwezig kunnen zijn; op een later moment alleen complete fagen. Het transport van cel tot cel via plasmodesmen zou

men zich kunnen denken door de kleinste deeltjes, het actieve nucleïnezuur; het latere transport door de vaten door complete virusdeeltjes. De vraag is nu of de actieve onbeschermde deeltjes het doden van een cel, waarbij allerlei enzymen vrijkomen, overleven. Wij kunnen ons voorstellen, dat dit niet het geval is, terwijl de beschermde virusdeeltjes meer weerstand bezitten. Men zou nu de onmogelijkheid om bladluizen uit dood weefsel of uit perssap virus te laten overbrengen kunnen verklaren, door aan te nemen, dat hierbij het actieve, onbeschermde nucleïnezuur voor overbrenging noodzakelijk is. Uit levend weefsel zou een bladluis dergelijke deeltjes uit de plasmodesmen kunnen opnemen. Indien dit juist is, kan men nooit redelijk succes verwachten van proeven waarbij men bladluizen uit perssap van zieke planten virus laat opnemen, daar men bij het bereiden van het perssap wellicht het vrije nucleïnezuur heeft vernietigd. Mechanische overbrenging vindt bij T.M.V. waarschijnlijk alleen dan plaats, indien compleet virus (met mantel) gebracht wordt dieper dan de buitenste laag van de intacte protoplast, terwijl bij infectie met het stoppelknolvirus tot op zekere hoogte geen verwonding van de protoplast vereist wordt. Deze theorie, volgens welke een intacte cel niet of zeer moeilijk met complete virusdeeltjes kan worden geïnfecteerd, zou kunnen verklaren, waarom het niet mogelijk is door het opvullen van de intercellulaire ruimten met perssap van zieke planten een plant te infecteren. Dit geldt zowel voor het T.M.V. als voor het stoppelknolvirus. Al mag met LAMBERTZ worden aangenomen, dat virus via ter plaatse aanwezige plasmodesmen binnen de levende protoplast terecht komt, dan moeten wij verder nog veronderstellen, dat in de cel, maar niet in haar buitenste laag, stoffen aanwezig zijn, die in staat zijn het actieve bestanddeel te ontdoen van de beschuttende en isolerende proteïnemantel. Dergelijke stoffen moet men zich — gelet op het negatieve resultaat van infectiepogingen van geplasmolyseerde cellen met T.M.V. — denken aanwezig te zijn dieper in de protoplast.

Bij de boven geschetste gedachtengang stuit men steeds weer op de moeilijkheid, dat verschillende bladluissoorten, ook al stemt de bouw van hun stiletten in hoge mate overeen, zich onderscheiden in hun vermogen om hetzelfde virus over te brengen.

Men zou kunnen veronderstellen, dat het speeksel de volgende eigenschappen bezit:

a. dat het complete virusdeeltjes meer of minder gemakkelijk van de virusmantel ontdoet.
b. dat het actief virus minder snel inactiveert.

Men kan zich zo dus b.v. voorstellen, dat T.M.V. niet door bladluizen wordt overgebracht, omdat het speeksel van iedere bladluissoort dit virus zou inactiveren. Misschien kan dit door het samenbrengen van bladluisspeeksel en T.M.V. nader worden onderzocht. Hierbij zou dan tevens moeten worden aangetoond, dat een virus slechts in actieve toestand de speekselschede zou kunnen doordringen en de stiletten bereiken.

INVLOED VAN STOFFEN OP DE OVERDRACHT VAN VIRUS UIT EEN GEISOLEERDE EPIDERMIS

1. INVLOED OP DE OVERBRENGING DOOR DE BLADLUIS

Wij vragen ons af of de virusoverdracht uit een afgetrokken epidermis door bepaalde stoffen kan worden bevorderd. Om dit te onderzoeken hebben wij verschillende stoffen gebruikt, die een specifieke werking op de stofwisseling uitoefenen (tabel 38). Hiertoe werden zieke bladeren van de tuinboon gedurende een half uur in oplossingen van deze stoffen in een exsiccator onder vacuüm gebracht. Hierna lieten wij 20 bladluizen op het aldus behandelde blad, gedurende 15 sec. zuigen, waarna wij de bladluizen afzonderlijk op 20 gezonde tuinboonplantjes zetten. Dezelfde bewerking pasten wij toe op afgetrokken onderepidermis van zieke tuinboonbladeren.

TABEL 38. Invloed van het impregneren met verschillende chemicaliën van blad en epidermis van tuinboon, besmet met lupinemozaïekvirus, op de overbrenging van dit virus door *Myzus persicae*.

TABLE 38. *Influence of the impregnation with different chemicals of diseased leaf and epidermis of broadbean, infected with lupin mosaic virus on the transmission of this virus by Myzus persicae.*

Geïmpregneerd chemisch middel *Chemical used for impregnating*	Virus overbrenging *Virus transmission*	
	Uit geïmpregneerd blad *Out of impregnated leaf*	Uit geïmpregneerde epidermis *Out of impregnated epidermis*
Na_2S, 0,01 mol.	11	0
Malonzuur, 5 × 10^{-2} mol. *Malonic acid*	13	1
KCN, 0,01 mol.	16	4
„	17	8
„	17	2
2-4 dinitrophenol, 10^{-4} mol.	14	1
Aethyl-urethaan 0,3 mol. *Ethylurethane*	10	1
Methyl-urethaan 1 mol. *Methylurethane*	9	0
Mono-joodazijnzuur 5 × 10^{-5} mol. CH_2JCOOH	17	0
K-malonaat 5 × 10^{-2} mol. *K-malonate*	20	4
„	13	0
Water	4	0
„	15	0

In deze proef (tabel 38) vallen twee stoffen direct op, omdat een bladluis uit de afgetrokken geïmpregneerde epidermis betrekkelijk goed het virus overbrengt. Dit zijn KCN en K-malonaat. Bij herhaling blijkt, dat dit waarschijnlijk een toeval was voor wat K-malonaat betreft, maar bij KCN blijft ook in de herhalingen deze goede overbrenging gehandhaafd. Het is zeer interessant, dat juist een stof als KCN de virusoverdracht uit een afgetrokken epidermis verbetert. Cyaniden staan immers bekend als behorend tot de meest krachtige vergiften. Wij mogen dan ook wel aannemen, dat naast het opnemen van virus geen voeding heeft plaatsgehad, daar anders ongetwijfeld het gebruik van KCN hoge mortaliteit onder de bladluizen zou hebben veroorzaakt.

Een oplossing van 0,01 mol. KCN reageert basisch — deze oplossing heeft een pH van 10,25, terwijl het door ons gebruikte water een pH van 7,8 had — zodat de vraag naar voren komt, of soms de veranderde zuurgraad van invloed is op de virusoverbrenging.

De invloed van de zuurgraad hebben wij daarom nagegaan met behulp van acetaatbuffer, waarin het intacte blad werd gedompeld. Hierna werd het blad in de bufferoplossing gedurende een half uur onder de waterstraalluchtpomp geplaatst. Zowel uit het geïmpregneerde blad, als uit de afgetrokken epidermis, werd met behulp van *Myzus persicae* de virusoverbrenging nagegaan. Per behandeling werden 20 gezonde tuinboonplanten gebruikt.

TABEL 39. Invloed van het impregneren met acetaatbuffer van verschillende pH van blad van tuinboon, besmet met lupinemozaïekvirus op de overbrenging van dit virus met behulp van *Myzus persicae*.

TABLE 39. *Influence of impregnating leaves of broadbean, infected with lupin mosaic virus with acetate buffer of different pH on the transmission of this virus by Myzus persicae.*

pH van geïmpregneerde buffer *pH of impregnated buffer*	Overbrenging door *Myzus persicae* uit: *Transmission by Myzus persicae from:*	
	Geïmpregneerd blad *Impregnated leaf*	Geïmpregneerde epidermis *Impregnated epidermis*
5	16	0
6	12	4
7	14	2
8	14	0

De resultaten van een herhaling van deze proef, waarbij alleen de overbrenging uit de afgetrokken epidermis werd nagegaan en van een tweede serie, waarbij bovendien KCN aan de bufferoplossing werd toegevoegd, zijn weergegeven in tabel 40.

TABEL 40. Invloed van het impregneren van ziek tuinboonblad met acetaatbuffer, waaraan al dan niet 0,01 mol. KCN was toegevoegd, op de virusoverbrenging door *Myzus persicae* uit afgetrokken epidermis van het aldus behandelde blad.

TABLE 40. *Influence of impregnating diseased leaves of broadbean with acetate buffer without or with 0,01 mol. KCN on the virus transmission by Myzus persicae from pieces of epidermis.*

Acetaat buffer		Acetaat buffer + 0,01 mol. KCN	
pH	Virusoverbrenging uit geïmpregneerde epidermis *Virustransmission from impregnated epidermis*	pH	Virusoverbrenging uit geïmpregneerde epidermis *Virustransmission from impregnated epidermis*
5,0	0	5,65	1
6,1	6	6,45	3
7,0	3	7,25	3
7,8	4	8,5	7

Naast de invloed, die KCN op de virusoverdracht uitoefent, blijkt uit deze proeven (tabellen 39 en 40), dat de zuurgraad ook een belangrijk effect heeft. Een buffer van pH 6 en in mindere mate een van pH 7 gaat voor een groot deel de inactivering tegen, die ontstaat als een gevolg van het aftrekken van de epidermis.

De werking van KCN geschiedt echter niet uitsluitend doordat deze stof de pH beïnvloedt. Wel merken wij op, dat deze stof juist bij de hoge pH 8,5 het meest werkzaam is.

2. INVLOED OP DE MECHANISCHE OVERBRENGING

Beïnvloedt KCN ook de mechanische overbrenging? Om dit na te gaan werden zes bladhelften van White Burley tabak met behulp van carborundum geïnoculeerd met sap van bladeren van *Nicotiana glutinosa*, besmet met stoppelknolvirus. Dit sap was echter vooraf verdund met een gelijk volumedeel water of met een 0,01 mol. KCN oplossing. In totaal gaf de virusoplossing met water 315 vlekjes en de virusoplossing verdund met een KCN oplossing 293 vlekjes.

Een gelijke proef voerden wij uit met sap van tuinboonplanten, besmet met het lupinemozaïekvirus, waaraan òf voor de helft water, òf voor de helft acetaatbuffer van pH 8 was toegevoegd. Met de zo verkregen oplossingen konden met behulp van carborundum resp. 13 en 14 tuinboonplanten uit een totaal van 21 planten per serie geïnfecteerd worden. Op de mechanische virusoverbrenging heeft dus een KCN oplossing of een pH buffer van zuurgraad 8 geen invloed. De overbrenging van het virus door een bladluis werd door impregnatie van de epidermis met KCN en buffer onafhankelijk van elkaar bevorderd.

GEEFT HET EFFECT, DAT BESTRALING MET ULTRAVIOLET LICHT OP HET VIRUS HEEFT, EEN VERKLARING VOOR ONZE PROBLEMEN?

Daar de mogelijkheid bestaat, dat bij bestraling van de plant met ultraviolet licht het virus, dat de bladluis opneemt, anders reageert dan het mechanisch overgebrachte virus, hebben wij getracht hierover nadere gegevens te verkrijgen.

Bawden e.a. (1954) constateerden, dat de mechanische overbrenging van het stoppelknolvirus met 80% afneemt, als gevolg van bestraling gedurende 5 min. van beide bladkanten van een geïnfecteerd blad van stoppelknol en de overbrenging door *Myzus persicae* met 90%. Na bestraling van met T.M.V. besmette bladeren constateerden zij deze afname echter niet. Dit virus zou meer resistent zijn tegen bestraling met ultraviolet licht en in hogere concentratie in het dieper liggende bladweefsel voorkomen, terwijl het stoppelknolvirus vooral in de epidermis gelokaliseerd zou zijn.

Bradley (1954) vond voor aardappel Y-virus een sterke afneming van de virusoverbrenging door een bladluis na een bestraling van het zieke blad met ultraviolet licht, terwijl de mechanische overbrenging praktisch niet beïnvloed werd. Ook hij concludeerde, dat het virus door bestraling met ultraviolet licht alleen in de epidermis geïnactiveerd wordt. Het effect van bestraling met ultraviolet licht blijkt na enkele dagen te zijn verdwenen.

Benda (1955) constateert echter, dat 25-50% van de bestraling via de epidermis in diepere cellagen doordringt.

Bawden & Kleczkowsky (1955) toonden aan, dat 7 plantevirussen het verschijnsel van „*photoreactivation*" vertoonden, terwijl zij dit voor T.M.V. niet waarnamen. Onder *photoreactivation* verstaan zij het verschijnsel, dat planten, indien ze na inoculatie met de virusoplossing, waarvan het virus gedeeltelijk geïnactiveerd was door bestraling met ultraviolet licht, in daglicht werden geplaatst, meer lokale vlekken vertoonden, dan wanneer zij in het donker werden gehouden. Indien de bestraalde virusoplossing echter zelf in het zichtbare licht werd geplaatst, werd de inactivering niet opgeheven (Bawden & Kleczkowski 1953). Deze auteurs achten het mogelijk, dat de veranderingen, die een bestraling met ultraviolet licht bij de virusdeeltjes teweeg gebracht heeft, door zichtbaar licht teniet gedaan worden of dat door bestraling met zichtbaar licht de voorwaarden in zulke cellen gunstig zijn voor virusvermeerdering.

Benda (1955) veronderstelt, dat de inactivering door ultraviolet licht een gevolg is van een combinatie van verscheidene effecten. Hoewel door bestraling met ultraviolet licht de infectiositeit van het virus verminderd wordt, veranderen toch zijn fysisch-chemische en serologische eigenschappen niet (Bawden & Pirie 1938 a en b).

Allereerst hebben wij nagegaan of ook wij met ultraviolet licht hetzelfde effect verkregen als de aangehaalde auteurs. Hiervoor gebruikten wij een Hanovia lamp model 13A *(Slough, Bucks, England)*. Van de straling is 11% zichtbaar en heeft 85% een golflengte van 253,7 mμ. Na meting bleek, dat wij onze objecten op een afstand van 50 cm van de lamp moesten plaatsen om dezelfde stralingsintensiteit te verkrijgen als waarmee BAWDEN e.a. (1954) werkten.

Indien wij bladeren namen van *Nicotiana glutinosa*, die symptomen vertoonden van stoppelknolvirus en wij bestraalden de ene helft van ieder blad aan beide zijden gedurende 5 min. met ultraviolet licht, terwijl de andere helften als controle fungeerden, dan verkregen wij na uitstrijk van perssap van bestraalde bladhelften 23 vlekken, van onbehandelde controlebladhelften 94 vlekken op 9 bladstukken White Burley tabak. Lieten wij in een tweede proef de bestraalde zieke bladhelften echter twee uur in het donker of in het licht op vochtig filtreerpapier liggen, alvorens ze fijn te maken, dan werden op 6 bladstukken van White Burley tabak 266 vlekken gevormd, indien de zieke bladhelften na bestraling in het donker hadden gelegen en 827 vlekken, indien de zieke bladhelften na bestraling in het licht hadden gelegen. In een derde proef gaf het direct inoculeren van bestraald blad op 6 bladstukjes White Burley tabak 46 vlekjes en inoculatie van de overeenkomstige bladhelften van de bestraalde bladeren, nadat ze 2 uur in het zonlicht hadden gestaan, 205 vlekken. Uit deze proeven blijkt, dat wij dezelfde resultaten verkregen als de aangehaalde auteurs.

In een proef (tabel 38), die wij reeds eerder besproken hebben, bleek, dat KCN het effect, dat het aftrekken van de epidermis veroorzaakt op de virusoverbrenging door een bladluis, enigszins tegengaat. Wij wilden nagaan of KCN ook het effect van bestraling met ultraviolet licht tegengaat. Hiertoe hebben wij sap van met stoppelknolvirus besmette bladeren van *Nicotiana glutinosa*, die al of niet geïmpregneerd waren met 0,01 mol KCN onder de waterstraalluchtpomp, ofwel direct uitgestreken op 6 bladstukken White Burley tabak, ofwel nadat ze bestraald waren met ultraviolet licht. Op 6 bladstukken White Burley tabak werd de virusactiviteit nagegaan.

Tabel 41. Invloed van impregnatie met 0,01 mol. KCN op het effect van bestraling gedurende 10 min. met ultraviolet licht. De proef werd uitgevoerd met *Nicotiana glutinosa* bladeren, besmet met stoppelknolvirus.

Table 41. *Influence of the impregnation with 0,01 mol. KCN of leaves of Nicotiana glutinosa, infected with cabbage blackring virus on the effect of a 10 min. ultraviolet radiation.*

Behandeling *Treatment*	Sapinoculatie *Sap-inoculation*	Aantal lokale vlekjes op 6 bladstukken White Burley tabak *Number of local lesions on 6 pieces of White Burley tobacco leaves*			
		Onbehandelde bladeren *Untreated leaves*		Bladeren geïmpregneerd met KCN *Leaves impregnated with KCN*	
		Individual numbers	*Total*	*Individual numbers*	*Total*
Onbestraald	direct	214, 278, 119	938	80, 230, 80	682
Not irradiated		105, 97, 125		97, 68, 127	
Bestraald	direct	19, 44, 23	158	81, 187, 78	474
Irradiated		37, 9, 26		55, 20, 53	
Bestraald	na 4 uur	52, 198, 83	540	24, 57, 27	167
Irradiated	*after 4 h.*	94, 24, 89		19, 4, 36	

De cijfers van de waarnemingen (tabel 41) werden eerst stuk voor stuk getransformeerd met de formule y = 1000 x log (x + c) van Kleczkowski (1949), waarin x het getelde aantal vlekjes is en c in dit geval werd bepaald op 40. Nu was er een variantie-analyse mogelijk geworden. Het al of niet impregneren met KCN had een zeer significante [1]) invloed op het effect van de bestraling. Daarom werden de resultaten van de beide series afzonderlijk geanalyseerd. Hierbij bleek, dat in de niet met KCN geïmpregneerde serie de direct na bestraling geïnoculeerde bladeren *zeer* significant minder vlekjes vertoonden, dan de onbestraalde en ook *zeer* significant minder dan de 4 uur na bestraling geïnoculeerde bladeren. Het verschil tussen onbestraalde en 4 uur na de bestraling geïnoculeerde bladeren was significant.

Bij de met KCN geïmpregneerde bladeren was de afneming in aantal lokale vlekjes tussen onbestraalde en direct na bestraling geïnoculeerde bladeren niet significant; 4 uur na bestraling met ultraviolet licht werden significant *minder* vlekjes gevormd dan direct na de bestraling, terwijl het verschil met niet bestraalde bladeren *zeer* significant was. [2])

[1]) Significant is het verschil, indien de P-waarde minstens 0,95 bedraagt; zeer significant, indien deze minstens 0,99 is.

[2]) Op deze plaats zeggen wij de heer C. A. van den Anker gaarne dank voor de statistische bewerking, die door hem werd uitgevoerd.

Het effect, dat impregnatie met KCN op de mechanische virusoverbrenging heeft, hebben wij daarom nagegaan. LEBEN & FULTON (1952) hadden reeds opgemerkt, dat, indien men KCN aan een oplossing toevoegde, waarop met tabaksnecrosevirus geïnoculeerde blaadjes van voedererwt *(Cowpea, Vigna sesquipedalis)* dreven, zich hierop geen lokale vlekjes vormden. KCN beïnvloedde de virusoverdracht echter niet, wanneer het tegelijk met het inoculum werd fijngewreven. Wij gingen bij bestraling met ultraviolet licht uit van zieke bladeren. Bij onze proeven over de invloed van KCN deden wij dat dus ook. De proefopzet was als volgt. Met sap van zieke bladeren van *Nicotiana glutinosa,* besmet met stoppelknolvirus, werden òf direct 6 bladstukken White Burley tabak ingewreven òf 2, 4 en 8 uur nadat de zieke bladeren van *Nicotiana glutinosa* in een 0,01 mol. KCN-oplossing in een exsiccator met behulp van een waterstraalluchtpomp geïmpregneerd waren.

TABEL 42. Het effect, dat impregnatie met 0,01 mol. KCN van bladeren van *Nicotiana glutinosa,* besmet met stoppelknolvirus, heeft op de mechanische virusoverbrenging.

TABLE 42. *The effect of impregnation with 0,01 mol. KCN of leaves of Nicotiana glutinosa, infected with cabbage blackring virus on the mechanical virus transmission tested on 6 leaf-parts of White Burley tobacco.*

Behandeling *Treatment*	Inoculatie *Inoculation*	Aantal lokale vlekjes *Number of local lesions*
Onbehandeld *Untreated*	direct	508
Geïmpregneerd met KCN *Impregnated with KCN*	direct	612
„	na 2 uur, *after 2 h.*	231
„	na 4 uur, *after 4 h.*	140
„	na 8 uur, *after 8 h.*	3

De bladeren van White Burley, die voor de proef werden gebruikt, werden na inoculatie normaal belicht, maar geen spoor werd gevonden van reactivering van het virus, zoals uit tabel 42 blijkt. Het is duidelijk, dat KCN, indien dit gedurende langere tijd op weefsel inwerkt, het daarin aanwezige virus langzamerhand irreversibel inactiveert. Belichting heeft hierop geen storende invloed, daar de zieke bladeren, nadat ze met KCN waren geïmpregneerd, alvorens ze werden fijngewreven, normaal belicht werden. De invloed, die KCN en ultraviolet licht uitoefenen op virus is dus geheel verschillend.

Verdwijnt het virus nu even snel uit de celwand als het uit de protoplasten verdwijnt? Om dit na te gaan gingen wij uit bladeren van *Nicotiana glutinosa,* die besmet waren met het stoppelknolvirus en geïmpregneerd waren met 0,01 mol. KCN-oplossing, zowel de mechanische virusoverbrenging als de virusoverbrenging met behulp van bladluizen na. Dit zou

enig inzicht moeten geven, daar bladluizen het virus uit de celwanden opnemen, terwijl bij mechanische overbrenging met carborundum waarschijnlijk virus uit de protoplasten wordt verbruikt.

TABEL 43. Mechanische virusoverbrenging en overbrenging met behulp van *Myzus persicae* uit blad van *Nicotiana glutinosa*, besmet met het stoppelknolvirus en geïmpregneerd met 0,01 mol. KCN.

TABLE 43. *Mechanical virus transmission as well as virus transmission by Myzus persicae from leaves of Nicotiana glutinosa infected with cabbage blackring virus and impregnated with 0,01 mol. KCN.*

Behandeling *Treatment*	Inoculatie *Inoculation*	Mechanische overbrenging op 2 bladstukken White Burley tabak *Mechanical transmission on 2 leaf parts of White Burley tobacco*	Overbrenging door 20 *Myzus persicae* *Aphid transmission*
Onbehandeld *Untreated*	direct	26 — 15	2 — 0
Geïmpregneerd *Impregnated*	direct	63 — 74	2 — 3
Geïmpregneerd *Impregnated*	na 4 uur *after 4 h.*	4 — 5	1 — 2
Geïmpregneerd *Impregnated*	na 8 uur *after 8 h.*	1 — 1	0 — 1

De overbrenging van het virus door de bladluis, ook uit de onbehandelde bladeren, is slechts gering (tabel 43). Bij herhalingen van deze proef werd geen betere overbrenging verkregen. Opvallend is echter, dat 8 uur na het impregneren van het geïnfecteerde blad met KCN, wanneer langs mechanische weg praktisch geen virus meer is aan te tonen, toch enige overdracht door de bladluis plaats vindt. Dit suggereert, dat de KCN-behandeling het virus in de toestand, waarin het mechanisch kan worden overgebracht, grotendeels vernietigt, maar in zeer veel mindere mate in de toestand, waarin het door bladluizen wordt overgedragen.

Kan het effect van een bestraling met ultraviolet licht niet berusten op de vorming van een stof, die het virus slechts tijdelijk inactiveert? Hiertoe namen wij de volgende proef. Gezonde bladeren van *Nicotiana glutinosa* werden doormidden gesneden over de hoofdnerf. De ene helft werd direct fijngemaakt, de andere helft na bestraling van beide bladkanten met ultraviolet licht gedurende 10 min. De verkregen hoeveelheden vloeistof werden aangevuld met gelijke volumedelen van een verdunde oplossing T.M.V. of met een oplossing van stoppelknolvirus en getoetst op tien halve *Nicotiana glutinosa* bladeren of 10 bladstukjes White Burley tabak.

TABEL 44. Effect op de mechanische virusoverdracht van het mengen van een virusoplossing met gelijke volumina sap, geperst uit gezonde bladeren van *Nicotiana glutinosa*, die òf onbestraald bleven, òf gedurende 10 min. op beide bladkanten bestraald waren met ultraviolet licht en ten dele daarna weer met zichtbaar licht belicht werden.

TABLE 44. *The effect on the mechanical virus transmission of mixing a T.M.V. or a cabbage blackring virus suspention with equal volumes of sap pressed from healthy leaves of Nicotiana glutinosa that were left untreated or irradiated during 10 min. on both sides with ultraviolet light and afterwards partly exposed to visible light.*

Behandeling *Treatment*	Aantal lokale vlekjes *Number of local lesions*
T.M.V. + sap van onbehandeld blad „ + *sap of untreated leaf*	685
„ + sap van blad direct na bestraling „ + *sap of leaf, expressed immediately after irradiation with ultraviolet light*	221
„ + sap van blad 4 uur na bestraling „ + *sap of leaf expressed 4 h. after irradiation with ultraviolet light*	496
S.K.V. + sap van onbehandeld blad *Cabbage blackring virus + sap of untreated leaf*	87
„ + sap van blad direct na bestraling „ + *sap of leaf expressed immediately after irradiation with ultraviolet light*	34
„ + sap van blad 4 uur na bestraling „ + *sap of leaf expressed 4 h. after irradiation with ultraviolet light*	47

Naast een mogelijke directe invloed van de bestraling met ultraviolet licht op het virus, blijkt uit deze proef (tabel 44), dat in de bestraalde bladeren, die geen virus bevatten, alleen al door de bestraling een stof of stoffen gevormd worden, die vermengd met een virusoplossing, de virusactiviteit in deze oplossing tegengaat. Stelt men zo'n bestraald blad gedurende een aantal uren bloot aan gewoon zonlicht, dan wordt blijkbaar de remstof weer ten dele afgebroken, hetgeen blijkt uit de vorige tabel.

De volgende stap bestond hierin, dat wij wilden nagaan of deze remming ook uitgaat van water, dat bestraald wordt met ultraviolet licht. Hiertoe werd water, dat in een zo dun mogelijke laag in een petrischaal stond, gedurende 10 min. met ultraviolet licht bestraald. Aan onbestraald en bestraald water werd een gelijke hoeveelheid van een verdunde T.M.V.-oplossing toegevoegd. Door uitstrijken op 5 halve *Nicotiana glutinosa* bladeren werd de virusactiviteit van de oplossing nagegaan.

TABEL 45. Invloed op de virusoverbrenging uit een oplossing van T.M.V., indien men deze vermengt met gelijke delen water, dat al dan niet bestraald is met ultraviolet licht.

TABLE 45. *Influence on the virus transmission when a suspension of T.M.V. is diluted with an equal volume of water or with an equal volume of water, that had been irradiated with ultraviolet light during 10 min.*

Behandeling *Treatment*	Aantal lokale vlekjes op 5 corresponderende bladhelften *Number of local lesions on 5 corresponding leafhalves*	Gemiddelde *Mean*	Gemiddeld verschil *Mean difference*
T.M.V. + water	124 - 87 - 93 - 122 - 172	119,6	43,2 ± 8,7
T.M.V. + bestraald water *T.M.V. + irradiated water*	90 - 59 - 16 - 82 - 135	76,4	
T.M.V. + water	137 - 158 - 62 - 65 - 117	107,8	48,4 ± 19,7
T.M.V. + water, dat 4 uur geleden bestraald was *T.M.V. + water irradiated 4 h. before*	97 - 42 - 7 - 71 - 80	59,4	

Volgens deze proef (tabel 45) geeft bestraald water dus vermindering van het aantal lokale vlekken. Blijkbaar wordt dus ook in water, dus in een dode stof, onder invloed van bestraling met ultraviolet licht een stof gevormd, die het virus inactiveert. De verschillen met onbehandeld water zijn zéér betrouwbaar direct na de bestraling; 4 uur na bestraling is de standaardafwijking zodanig, dat de kans ruim 90% is, dat dit verschil inderdaad bestaat. De remstof wordt onder invloed van zichtbaar licht niet of niet snel afgebroken, zoals bleek, wanneer bestraald water 4 uur aan zichtbaar licht werd blootgesteld en daarna pas met de T.M.V.-oplossing werd vermengd.

Wordt alle virus in de epidermis wel gedood na bestraling met ultraviolet licht? Wij meenden dit te kunnen nagaan door bladeren van *Nicotiana glutinosa* op verschillende tijden na de inoculatie gedurende 10 min. met ultraviolet licht te bestralen. Wij veronderstelden, dat bestraling kort na de infectie wel alle virus zou doden. Wij gebruikten 10 bladhelften per behandeling.

Tabel 46. Invloed van een bestraling van 10 min. met ultraviolet licht op verschillende tijdstippen, nadat de bladeren van *Nicotiana glutinosa* met een T.M.V. oplossing werden geïnoculeerd.

Table 46. *Influence of irradiation during 10 min. with ultraviolet light at different intervals after the inoculation of leaves of Nicotiana glutinosa with a solution of T.M.V.*

Tijdsduur na inoculatie, waarop bestraling plaatsvond *Interval between inoculation and irradiation*	Aantal lokale vlekjes *Number of local lesions*
Controle	2041
0 uur	39
1½ uur *(1,5 h.)*	321
3 uur	689
6 uur	1121
9 uur	1586
12 uur	2149
24 uur	1973

Indien wij de cijfers van tabel 46 grafisch tegen de tijd uitzetten, dan blijkt er een rechtlijnig verband te bestaan tussen het aantal gevormde lokale vlekjes en het aantal uren, dat verliep tussen de bestraling met ultraviolet licht en de inoculatie met T.M.V. Ook onmiddellijk na de inoculatie wordt echter niet alle virus geïnactiveerd. De uitspraak van Bawden (1954), dat het virus in de epidermis tengevolge van een bestraling met ultraviolet licht geïnactiveerd wordt, is dus niet geheel juist. Twaalf uur na de inoculatie heeft bestraling met ultraviolet licht geen invloed meer op het aantal lokale vlekjes, dat uiteindelijk is gevormd.

Siegel & Wildman (1956) hebben het effect van een bestraling met ultraviolet licht op de virusvermeerdering eveneens, doch meer gedetailleerd, nagegaan. Zij vinden geen rechtlijnig verloop, maar onderscheiden drie fasen van gevoeligheid voor ultraviolet licht. De snelheid, waarin deze fasen verlopen, wordt door de temperatuur beïnvloed; bij 20° C. is dit 5 uur voor de drie fasen tezamen. Gedurende de eerste fase is de gevoeligheid van het virus in het geïnoculeerde blad dezelfde als van het virus in vitro. Gedurende de tweede fase neemt de resistentie tegen een bestraling met ultraviolet licht toe en de derde fase wordt gekarakteriseerd door een tweede plateau van resistentie. Hun verklaring hiervoor is, dat gedurende de eerste fase het virusdeeltje op de te infecteren plaats gehecht zit, doch nog niet in de plantecel zou zijn doorgedrongen. Op de buitenkant van het blad zou het aan de volle werking van het ultraviolette licht zijn blootgesteld. Tijdens de tweede fase heeft het binnendringen van het virus in de cel plaats en wordt het virus gedeeltelijk door de celwanden en het plasma voor de straling en de stralingsprodukten beschermd. De derde fase zou een periode van afwachting zijn, voordat met de virusvermeerdering begonnen wordt.

In herhalingen van de proef, weergegeven in tabel 46, hebben wij de geïnoculeerde bladeren na kortere perioden (0, 1/2, 1, 1 1/2 uur enz.) na de inoculatie bestraald met ultraviolet licht. Hierbij konden wij de waarnemingen van SIEGEL & WILDMAN over het bestaan van drie fasen van gevoeligheid bevestigen.

Ons doel was echter niet het bestuderen van dit proces, maar om na te gaan of het virus in de epidermis na bestraling met ultraviolet licht ook werkelijk gedood wordt.

Ook SIEGEL & WILDMAN vinden in hun proeven met bestraling, vlak na de inoculatie, dat 5 - 10% van het virus infectieus blijft.

Hoe is nu de overbrenging door *Myzus persicae* van het lupinemozaïekvirus uit met ultraviolet licht bestraalde bladeren? Om dit na te gaan werden bladeren van tuinboon, besmet met lupinemozaïekvirus, aan weerszijden gedurende 10 min. bestraald. Groepen van 20 tuinboonplanten werden mechanisch geïnoculeerd met behulp van carborundumpoeder met perssap van bladeren besmet met lupinemozaïekvirus, die al of niet met ultraviolet licht bestraald waren. Tegelijkertijd werd met bladluizen, die tevoren gevast hadden en 15 sec. op de virusbron hadden gezogen, getracht virus over te brengen uit besmette bladeren, die al of niet vlak tevoren met ultraviolet licht waren bestraald. In een andere serie werd de virusbron eerst 4 uur na afloop van de bestraling gebruikt.

In een tweede proef werd alleen de virusoverdracht door de bladluis 0, 4 en 8 uur na de bestraling met ultraviolet licht nagegaan.

TABEL 47. Virusoverdracht, zowel op mechanische wijze als door *Myzus persicae* uit bladeren van tuinboon, besmet met het lupinemozaïekvirus, die niet of gedurende 10 min. aan beide zijden bestraald waren met ultraviolet licht.

TABLE 47. *Transmission of lupin mosaic virus from infected leaves of broadbean by means of carborundum or by Myzus persicae. The infected leaves were irradiated with ultraviolet light on both sides during 10 min. or were left untreated.*

Behandeling *Treatment*	Inoculatie *Inoculation*	Virusoverdracht *Virus transmission*: Mechanisch *Mechanical*	Door *Myzus persicae* / *By Myzus persicae*: proef 1, *exp. 1*	proef 2, *exp. 2*
Onbehandeld *Untreated*	direct *immediately*	17	16	15
Bestraald met ultra violet licht *Irradiated with ultra-violet light*	direct *immediately*	12	4	0
„	na 4 uur, *after 4 h.*	12	4	0
„	na 8 uur, *after 8 h.*			4

Deze proef (tabel 47) suggereert, dat de bestraling met ultraviolet licht een opname door bladluizen uit de epidermis tot geruime tijd na de bestraling zeer bemoeilijkt, terwijl de mechanische overbrenging in mindere mate wordt gehinderd. Dit stemt redelijk overeen met de veronderstelling van BAWDEN, HAMLYN & WATSON (1954), dat virus in de epidermis in het bijzonder door ultraviolet licht wordt vernietigd, dieper in het blad aanwezig virus in mindere mate. Bladluizen nemen immers speciaal virus uit de epidermis op, zoals wij eerder zagen, en dit lijkt daar in mindere mate beschikbaar te zijn.

Samenvattend wijzen de in dit hoofdstuk besproken proeven uit, dat KCN het proces van het inactiveren van het virus in de afgetrokken epidermis tegengaat en dat zichtbaar licht in de levende cel de remstof, gevormd door het ultraviolette licht, inactiveert.

INVLOED VAN DE KLEUR VAN DE ONDERGROND OP HET ZUIGEN VAN DE BLADLUIS

MOERICKE (1950) stelde vast, dat belichting met geel of groen licht van 580-510 mμ of het plaatsen van een bladluis op een geel of groen substraat van grote invloed was op de neiging van het dier tot zuigen. Bij onze proeven viel op, dat bladluizen op schilfertjes epidermis bij voorkeur daar zogen, waar nog groen weefsel aan de epidermis gehecht was. Toen wij nog niet met MOERICKE's onderzoek bekend waren, gebruikten wij als ondergrond van een afgetrokken epidermis (dus een epidermis vrij van bladgroen) een blad van *Kalangoë* of van lidcactus *(Zygocactus truncatus)*. Dit was zeer bevorderlijk voor onze proeven. Voorts werd bij het gebruik maken van drukcellen storing ondervonden van de geelkoperen ringen, die de plastic membraan in positie hielden. De bladluizen vertoonden sterke neiging het membraan te verlaten en zuigpogingen te ondernemen op de geelkoperen ringen.

Bij virusonderzoek, waar zuigtijden van bladluizen een onderwerp van studie zijn, dient men dus rekening te houden met de resultaten van MOERICKE. Wij hebben hierover nog enige proeven gedaan. Op een stuk filtreerpapier plaatsten wij een rond stukje geel, wit of groen papier met een diameter van 30 mm. Het gekleurde stukje papier werd bedekt met een stuk afgetrokken epidermis van het blad van een tulp. In het midden boven dit papiertje werd op de epidermis een bladluis geplaatst, die van tevoren enkele uren gevast had. Opgenomen werd na hoeveel tijd de bladluis zoog en hoelang zij zoog. Indien zij niet boven het rondje zoog, maar er van af liep, dan werd dit genoteerd en werd met een andere bladluis de proef voortgezet. Met een aantal van 36 bladluizen werden voor iedere gebruikte kleur deze waarnemingen verricht.
Volgens de „*Horticultural Colour Chart. II*", uitgegeven door „*The British Colour Council in collaboration with the Royal Horticultural Society*", waren de gebruikte kleuren *Chrysocolla green 56* en *Dresden yellow 64*.

TABEL 48. Invloed, die de kleur van de ondergrond uitoefent op het zuigen van 3 groepen van 36 *Myzus persicae*.

TABLE 48. *Influence of the colour of the background on the probing of 3 groups of 36 Myzus persicae.*

Kleur van het papier *Colour of the paper*	Weggelopen van het papier *Walked of the paper*	Looptijd op het papier *Time of walking on the paper*	Gemiddeld *Mean*	Zuigtijd *Feeding-time*	Gemiddeld *Mean*
Geel - *yellow*	1	5-55 sec.	12,7 sec.	8-124 sec.	40 sec.
Wit - *white*	33	10-40 sec.	21,7 sec.	5- 40 sec.	18,3 sec.
Groen - *green*	1	3-28 sec.	10,5 sec.	9-106 sec.	37 sec.

De verschillende kleuren, die als ondergrond werden gebruikt, beïnvloedden dus in zeer sterke mate het zuigen van de bladluis (tabel 48). Bijgevolg zal bij verdere proeven van deze aard met veel succes gebruik kunnen worden gemaakt van de invloed van licht van verschillende golflengten op de gedragingen van de proefdieren. Onbekendheid met het werk van MOERICKE was de oorzaak, dat wij niet reeds van het begin van het onderzoek af hiermede ons voordeel deden.

HOOFDSTUK XI

SAMENVATTING EN CONCLUSIE

In het eerste hoofdstuk werd aan de hand van de literatuur een overzicht gegeven van de bestaande opvattingen over de manier van overbrenging van non-persistente virussen.

Daar inlichtingen over de bouw van de stiletten van de bladluis nog op gegevens berustten uit het jaar 1928, gingen wij dieper op deze kwestie in. Met behulp van de elektronenmicroscoop konden op de mandibels en op de maxillen structuren zichtbaar worden gemaakt, waarvan het bestaan niet bekend was. De chitinelijsten, die op de stiletten werden gevonden, zijn waarschijnlijk zeer belangrijk voor de virusoverdracht. Wij veronderstelden, dat in de groeven achter de randen van deze lijsten het virus mechanisch wordt getransporteerd. Worden deze groeven verstopt, b.v. doordat de bladluis in paraffine steekt, dan is virusoverdracht praktisch onmogelijk geworden. Ook de dwarse doorsnede van de stiletten bleek anders te zijn, dan in de literatuur vermeld is.

Met behulp van uitgeprepareerde stiletten kon geen virusoverdracht worden bewerkstelligd, ook niet indien virushoudende vloeistof op de stiletten van een levende bladluis werd gebracht of op de wond, die gemaakt werd door een van de antennes af te knippen.

Omdat op deze manier niets werd bereikt, hebben wij nagegaan hoe de weg van de stiletten van de bladluis is in een afgetrokken epidermis. Hierbij zagen wij de waarnemingen van verschillende onderzoekers bevestigd, dat de bladluizen *Myzus persicae* Sulzer en *Aphis fabae* Scop. vooral intercellulair zuigen.Wij konden enige malen waarnemen, dat bladluizen, die uitsluitend intercellulair gezogen hadden op zieke epidermis, daarna in staat bleken gezonde planten te besmetten. Geconcludeerd werd, dat deze bladluizen het virus uit de celwand opnamen. Het bleek evenwel, dat het zeer moeilijk is uit een afgetrokken epidermis van een tuinboonplant, besmet met lupinemozaïekvirus, virus over te doen brengen, terwijl dit uit een intact blad bepaald niet moeilijk is.

In hoofdstuk VI trachtten wij de oorzaak van deze verminderde overbrenging na te gaan. Wij vonden, dat de bladluis uit ziek blad, dat met behulp van warmte, koude of chemicaliën gedood werd, geen virus meer kon overbrengen. Dat de druk in het gezonde planteweefsel, in de celwand eventueel via de plasmodesmen, hierbij geen rol speelt, werd aannemelijk door het negatieve resultaat van de proeven, waarbij de bladluis op een cel met een overdruk van 12 atmosfeer zoog en uit de proeven tot overbrenging van virus uit geplasmolyseerde bladeren.

Dat de mechanische virusoverbrenging op een ander proces zou berusten dan de virusoverbrenging, zoals deze door de bladluis geschiedt, volgde uit die proeven, waarbij zowel met geplasmolyseerd als met gedeplasmolyseerd blad werd gewerkt. De bladluis steekt namelijk in de celwand en ondervindt derhalve weinig bezwaar bij het besmetten van gezonde bladeren, wanneer het weefsel hiervan geplasmolyseerd of gedeplasmolyseerd wordt. Voor mechanische virusoverdracht met behulp van carborundum bleek een

zekere celturgor van de te besmetten plant nodig te zijn. Gedacht werd, dat de virusreceptoren in de zin van de bacteriofagenliteratuur, zich onder de buitenwand van de protoplast bevinden. Kan de buitenwand door verminderde celspanning als een gevolg van plasmolyse, met behulp van carborundum niet meer worden opengelegd, dan is infectie van de cel ook onmogelijk geworden.

Nadat in hoofdstuk VII de verkregen resultaten nog eens overwogen werden, opperden wij de mogelijkheid, dat een bepaald virus in twee vormen kan voorkomen. De door bladluizen overgebrachte vorm zou de actieve vorm zijn (het nucleïnezuur). Komt het virus in deze vorm voor, dan kan het door verschillende ingrepen heel gemakkelijk geïnactiveerd worden. De vorm, waarin het virus bij mechanische overbrenging infectie veroorzaakt, is veel ongevoeliger (het complete virusdeeltje, voorzien van eiwitmantel). Het is mogelijk, dat dit een voor de bladluis inactieve virusvorm is, waaruit vrijwel alleen de virusreceptoren van de protoplasten de actieve virusvorm kunnen losmaken.

Het bestaan van deze twee virusvormen trachtten wij aan te tonen. Allereerst deden wij dit door na te gaan of er stoffen zijn, die het inactiveren van de „luisvorm" van het virus voorkomen. KCN voorkomt deze inactivering ten dele, evenals een buffer van pH 6 - 7.

KCN bleek echter nog een tweede werking te bezitten. Indien virusziek blad met deze stof werd geïmpregneerd, dan was na acht uur langs mechanische weg virusoverdracht uit dit blad vrijwel onmogelijk; virusoverbrenging met behulp van bladluizen kon echter nog wel tot stand komen. Uit alle proeven van deze aard bleek, dat overdracht van virus door bladluizen en mechanische virusoverdracht met behulp van carborundum vaak op zeer verschillende en onverklaarbare wijze wordt beïnvloed. Dit wettigde inderdaad het gebruik van een werkhypothese over twee virusvormen, zoals die door ons naar voren werd gebracht.

Uit proeven met ultraviolet licht bleek, dat tengevolge van een bestraling van gezonde bladeren, hierin en ook in water, als gevolg van deze bestraling een remstof gevormd wordt, die in staat is het virus te inactiveren. Door daglicht wordt de remming, die van deze stof uitgaat, alleen via een levende plantecel opgeheven.

Een duidelijk inzicht in alle factoren, die op het virus in de celwand inwerken en waardoor de overbrenging door de bladluis wordt beïnvloed hebben wij allerminst verkregen. Uit onze proeven bleek, dat remstoffen gevormd worden in het blad als gevolg van een bestraling met ultraviolet licht. Wij achtten het mogelijk, dat iets dergelijks plaatsvond als gevolg van het aftrekken van een epidermis. De volgende proeven van Bradley (1956) wijzen in deze richting. Deze auteur liet exemplaren van *Myzus persicae*, die aardappel Y-virus uit ziek White Burley blad hadden opgenomen, op een gezonde White Burley plant zuigen door een epidermis of door een vliesje van parafilm. Hij vond, dat dan zeer weinig planten besmet werden.

Indien hij de bladluizen hierna op een tweede toetsplant plaatste, die nu echter niet met epidermis of met parafilm bedekt was, dan constateerde hij, dat de bladluizen, die eerst op het parafilm zogen, 49 van de 60

toetsplanten infecteerden; dat is dus een overdracht van 82%. Hadden ze niet op parafilm gestoken, maar waren ze rechtstreeks op de toetsplant geplaatst, dan bedroeg de overbrenging 78%. Hier trad dus geen verschil met de controle naar voren. Hadden de bladluizen echter eerst door een epidermis van tulp gestoken, dan bedroeg de overbrenging slechts 15% (6 van de 40); bij de controle was dit 62%. Lieten BRADLEY & RIDEOUT in eerder uitgevoerde proeven (1953) besmette bladluizen eerst 5 min. zuigen op een normale toetsplant, dan kregen zij 88% infectie en werden de bladluizen hierna op een tweede toetsplant overgebracht dan bedroeg de infectie 63%. De vermindering in overbrenging veroorzaakt door de eerste steek in de epidermis van tulp wordt dus niet veroorzaakt door het normale verlies aan virus bij het infecteren van verschillende toetsplanten achtereenvolgens, maar door een specifieke invloed van de tulpenepidermis. Een mogelijke verklaring van dit verschijnsel is, dat in de epidermis van tulp, als gevolg van het aftrekken, remstoffen gevormd zijn, die het virus, dat de bladluis op zijn stiletten heeft, inactiveert. Het is jammer, dat BRADLEY niet heeft nagegaan in hoeverre tulpen op zichzelf een remstof tegen Y-virus bevatten, door de infectiositeit van besmette bladluizen te toetsen na voeding op een tulp.

Proeven om de juistheid van deze theorie langs andere weg te onderzoeken, gaven geen uitsluitsel.

Tenslotte vestigden wij de aandacht op de betekenis, die het werk van MOERICKE heeft voor proeven met de overbrenging van virus door bladluizen.

SUMMARY[1])

I. INTRODUCTION

In the introduction we review the recent literature on the mechanism of transmission of non-persistent viruses. The stylets, and especially their tips, appear to play a very important role. The latest information on the structure of the stylets and their apices dates from 1928, when electron-microscopes were not available. In order to get more detailed information we first studied the structure of aphid stylets under a light-microscope and later with an electron-microscope.

The penetration of stylets in the plant was followed in strips of epidermis by means of an oil-immersion-microscope. It appeared, as also others had published, that the penetration is predominantly intercellulair, and this lead to the conclusion that the virus used in transmission is picked up inside the cell wall. However, aphids transmit the virus only rarely from stripped epidermis of diseased leaves. We tried to investigate the cause of this hampered transmission (chapter VI).

Mechanical virus-transmission from dead tissue is very well possible, but virus-transmission by aphids from dead tissue could not be demonstrated. We finally concluded that the virus which is transmitted by

[1]) The author is greatly indebted to Dr. A. H. GOLD, Department of Plant Pathology, University of California, Berkeley, California, for correcting the English text.

aphids occurs in a form different from that which is transmitted mechanically. It is known that irradiation of virus with ultraviolet light inactivates the virus. The nature of this inactivation was investigated. We supposed that the hampered transmission of virus by aphids from stripped epidermis could be explained by an unfavourable effect caused by the stripping. Experiments of BRADLEY (1956) and BRADLEY & RIDEOUT (1953) suggest this.

II. STRUCTURE OF THE APHID STYLETS

With the aid of the electron-microscope we found structures at the apices of the maxillary and mandibulary stylets, which may be of great interest for an explanation of virus-transmission. The mandibulary stylets (photographs 1, 2 and 3) are provided with very fine ridges. These ridges often continue over the margin of the stylets. At about 5 μ from the apices of the stylets the ridges become shorter and at about 15 μ from the apices they disappear. The longitudinal section of the tip of the mandibulary stylet is given schematically in fig. 1. The central canal of the mandibulary stylets is interrupted and often branched; there is no terminal aperture. The acute apices of both maxillary stylets (photograph 6) are slightly twisted so that they never can touch. The salivary canal (photographs 4 and 5) ends 2 μ from of the apex of the stylet and the maxillary stylets slide along each other by means of interlocking furrows and ridges. Consequently the salivary canal and the alimentary canal do not always terminate at the same place (table 1). On one side of the maxillary stylets, hooks are present. The transvers section is represented in fig. 2 and in photographs 7 and 8. For making the transverse section, the aphids were fixed during some hours in OsO_4. The stylets were embedded in agar gel and impregnated with water under vacuum. After this the blocks of agar were transferred to alcohol 70% and later to metacrylate. This was polymerised and the sections were made with the ultra-microtome. Virus could be transported by the aphid inside the stylets or on the outside. More probable is a mechanical transmission of the virus behind the ridges on the tips of the maxillary and/or mandubilary stylets. In this regard the communication of BRADLEY (1956), that viruliferous aphids after having inserted their stylets in paraffine become non-infective, is important. The explanation could be that the ridges behind which the virus is transmitted are filled up with paraffine when the aphid probes in this material.

III. EXPERIMENTS TO DETERMINE THE MANNER OF VIRUS TRANSMISSION

According to a hypothesis of VAN DER WANT (1954) virus transmission by the aphid might occur by adsorption of the virus at the stylets. A healthy host plant would be infected if the virus were eluated off the stylets.

To test this hypothesis, stylets were dissected from aphids and stuck on a very fine metal needle. Adsorption was tested by consecutively dipping the stylets or a glass fiber of the same diameter in a droplet of sap obtained from a virus infected plant and in one of a healthy plant. *Phaseolus virus 1* was not transmitted by a glass fiber nor by the stylets. T.M.V. was only

transmitted by a glass fiber (table 2). Also wetting of the stylets with sap of diseased plants did not make an aphid transmit the virus. Since injection with virus into the aphid body resulted in a very high mortality, we wetted the wound, made by cutting off one of the antennae, with a virus suspension. We hoped that virus in this way would be absorbed to the blood of the aphid during the woundhealing process. With this method, however, we got transmission neither with the persistent leafroll virus from *Physalis floridana* nor with the non-persistent viruses potato virus Y from White Burley tobacco and lupin mosaic virus from broadbean.

IV. THE PATH OF THE STYLETS WITHIN THE HOST PLANT

In order to follow the path of the aphid stylets within the host plant we stripped the epidermal layer of hyacinth and followed the stylets with the aid of the oil-immersion of a light microscope (fig. 3). Like many authors before us we found that the path of the stylets is mainly intercellular. Before the aphid probes the epidermis it produces with saliva an imprint of the labium on the epidermis. This imprint is characteristic for the aphid species (photographs 9 and 10). Within the cell wall the salivary sheat his very regularly shaped; outside the cell wall this is not the case (photographs 11, 12, 13 and 14). The time for piercing the epidermis cells of hyacinth was 126 and 145 sec. for *Myzus persicae* and 152 and 155 sec. for *Aphis fabae* for fasted and non-fasted aphids (table 3), respectively *Myzus persicae* required 40 and 55 sec. for piercing the cell wall in the middle of the cell (b in fig. 4). When the stylets passed the epidermis at the transverse cell wall only half the cell wall (a in fig. 4) was pierced and the times were reduced to 20, 17 and 13 sec. (table 3). The time for piercing the epidermis cells of broadbean are of the same order as those of hyacinth (table 4). Later in the year (in June), however, we found much smaller data; we timed 59, 40, 35, 33 and even 25 sec. for the perforation of the epidermis at the transverse cell wall.

In an open space (within the cell, or when the stylets have passed the epidermis and the salivary sheath is formed in water) the salivary sheath makes a swinging movement (table 5). We suppose, that this movement is correlated with the up- and downward movements of the mandibulary stylets. The stylets tend to proceed in one direction (photographs 12, 14, 15 and 16). We suppose therefore that the stylets are guided passively by the cell walls, while they follow the middle lamella (fig. 5). Slight lateral deviation is possible, which was shown when the stylets perforated the simple salivary sheath at some distance from its apex, thereby producing branched salivary sheaths (photographs 15 and 16). BRADLEY (1956) assumed in his trials that an aphid always will sting into the epidermis of the test plant when probing through a strip of epidermis or a thin layer of parafilm, placed on the epidermis of the test plant. This, however, seems to us to be very improbable. Our experiments showed that in a similar experiment out of a total of 21 aphids tested, only 7 penetrated into the second epidermis, while 14 aphids made their salivary sheaths between the two epidermata.

V. WHERE DOES THE APHID PICK UP THE VIRUS?

We continued our experiments with an epidermis from a leaf of broadbean, infected with lupin mosaic virus. *Myzus persicae* only very rarely transmitted virus from this epidermis, while the transmission from an intact leaf of broadbean infected with lupin mosaic virus was very good. Not only from epidermis of broadbean, but also from stripped epidermis of *Nicotiana glutinosa* infected with cabbage blackring virus the transmission of virus by *Myzus persicae* was clearly hampered (table 8). In the two cases in which virus transmission from a stripped epidermis of broadbean infected with lupin mosaic virus was obtained, the aphids had pierced the transverse cell wall. From this fact and because the aphid mainly probes within the cell wall we conclude, that the aphid picked up the virus from inside the cell wall. The aphid can also transmit virus from the spongy parenchyma to intact plants, but more difficultly than from the intact leaf (table 8). The virus content of the parenchyma in this case was the same as that of the epidermis (table 7). However, the aphids pierce the parenchyma in another way than they pierce the epidermis. The epidermis is pierced through the cell wall and the spongy parenchyma is often pierced through the intercellular spaces. This less close contact between stylets and cell wall may account for the smaller incidence of virus transmission from the spongy parenchyma. Photograph 17, made from a stripped lower epidermis of a leaf of broadbean on which many aphids had fed, shows the salivary sheaths protruding from the cell walls of the epidermis. These salivary sheaths show the typical structure of having been formed in a free space. BAWDEN *et al.* 1954 do not account for these differences between epidermis and underlying tissue.

The converse of this problem is whether an infective aphid can infect a healthy epidermis. We removed all tissue except the lower epidermis from a local area of a leaf of a healthy broadbean plant (fig. 6). A viruliferous aphid, however, was not able to infect such plants when feeding on these windows.

VI. EXPERIMENTS TO TRACE THE CAUSE OF POOR VIRUS TRANSMISSION BY APHIDS FROM A STRIPPED EPIDERMIS

Papers on the structure of the cell wall and particularly on plasmodesmata are reviewed. By experiment we tried to obtain further information regarding the significance of plasmodesmata in the uptake of virus by aphids from the cell wall. In the next experiments broadbean plants infected with lupin mosaic virus were used as virus source and healthy broadbean plants as test plants. Our experiments were often repeated with a second virus. We then used *Nicotiana glutinosa* infected with cabbage blackring virus and White Burley tobacco as a test plant. The vector was always *Myzus persicae*.

1. *Influence of heat- or cold-treatment of a diseased leaf on virus transmission*

If the infected leaf was killed by means of heat or freezing, mechanical

transmission of virus from such leaves was still possible (table 9), but aphids could not transmit virus from such leaves. The reduced virus uptake by aphids began when the life of the cell was impaired (tables 10 and 11). Also mechanical virus transmission was affected by a 5 minutes dip in water of 48° or 50° C (table 12). This phenomenon is probably caused by coagulation of virus particles, for the virus activity of the supernatant liquid after centrifugation of heated sap obtained from leaves of broadbean infected with lupin mosaic virus was zero. The precipitate on the other hand showed a high infectivity (table 13).

2. *Influence of killing the infected leaf by means of chemicals on virus transmission*

The aphid cannot transmit the virus from infected leaves killed by various chemicals (table 14). Thus virus uptake seems to depend on whether the plant cell is alive or dead. Dipping the infected leaf in alcohol does not immediately kill the leaf, but impregnating the leaf in alcohol in vacuum kills it.

3. *Influence of impregnation of the infected leaf with water or with juice of healthy plants*

No effect on virus transmission by aphids was found (table 15) when infected leaves were impregnated with water or with healthy plant juice.

4. *Influence of water content of the infected leaf on virus transmission by aphids*

Decreasing the water content of the leaf that was the virus source, has a reducing effect on virus transmission by the aphid (table 16). However, this process is reversible (tables 17 and 18). Mechanical inoculation of test leaves that were dried out resulted also in less infection (table 19). Viruliferous aphids, however, could still infect partly dried test leaves (table 20).

5. *Experiments with a high pressure cell*

The lack of pressure in the dead tissue might be the cause of the impossibility of virus transmission by the aphid. To test this hypothesis we used an artificial cell (fig. 7) capable of withstanding a pressure of 12 atmospheres. The cell was filled with a virus suspension. Aphids could imbibe sap from this cell through a polyaethylene membrane. We never obtained virus transmission by these aphids (table 21).

6. *Influence of mechanical wounding of the infected leaf on virus transmission*

Mechanical wounding of infected leaves did not have the same effect on virus transmission as had tearing off the epidermis (tables 23, 24 and 26). When the epidermis was not torn off the leaf but cut off with a razor blade the reducing effect on virus transmission was relatively small (table 25).

7. *Influence of daylight on virus transmission*

LAMBERTZ (1954) observed a daily rhythm in the presence of the plasmodesmata. In the middle of the day there were only few plasmodesmata but during the night many were present. This lead us to investigate whether

there were differences in virus transmission by aphids during night- and day-time. In tables 26 and 27 our results are given. No effect of light on virus transmission was observed.

8. *Influence of plasmolysis or deplasmolysis on virus transmission*

When leaves are strongly plasmolysed the cytoplasm with the plasmodesmata withdraws from the cell walls. Aphids can transmit virus from plasmolysed infected leaves (tables 29 and 30) and virus-carrying aphids can infect plasmolysed healthy leaves (table 31). However, it appeared to be impossible to infect plasmolysed leaves mechanically (tables 32 and 34), but inoculation with T.M.V. after deplasmolysis does result in infection (table 35). When inoculated leaves were floated on a sugar-solution no influence on infection was observed (table 33). In this case, however, the leaves did not become plasmolysed as they did when the sugar-solution was forced into the leaves under vacuum. A hypothesis to explain these facts may be, that the inoculation by aphids and by mechanical means with carborundum as an abrasive does not take place in the same way. The aphid inserts its stylets into the cell wall, whereas carborundum opens the cell wall and perhaps even the outer part of the cytoplasm (the ectoplasm). Perhaps the latter must be wounded to infect the cell mechanically. If this is true the virus receptors are present under the ectoplast. To prove this, we wounded cell walls of plasmolysed leaves with carborundum. After floating the plasmolysed leaves on water the cell turgor was restored. But after dipping these leaves in a T.M.V. suspension infection rarely occurred (table 37). This was perhaps caused partly by closing of the wounds. Also in normal leaves less infection was obtained when the lapse of time between wounding and dipping the leaves into the virus suspension increased (table 36). But problably the failure of infection of plasmolysed protoplasts is caused because their walls, the ectoplasts, are not opened (fig. 8). A second possibility, which we think improbable is that the cell walls are not wounded by the abrasive when the cells are plasmolysed. With the aid of the electron-microscope we tried to trace the depth of the wounds caused by rubbing the cell walls of the epidermis with carborundum (photographs 18 and 19).

Cell walls free from protoplasts were prepared from the epidermis of an onion skin. With the ninhydrin reaction (Venekamp, 1956) the presence of nitrogen could be demonstrated in the epidermis when the protoplasts were still present, but if the protoplasts had been removed the reaction was always negative. The presence of cytoplasm in the cell wall therefore is unlikely at least in the epidermis of an onion skin.

VII. RECAPITULATION OF THE PRECEDING EXPERIMENTS

For virus transmission the aphid does not need pressure in the plant tissue. No cause could be found for the reducing effect on virus transmission, which is observed when aphids feed on the epidermis after this has been stripped from an infected leaf. However, aphids were not able to transmit virus from killed infected leaves, but, the cells in the stripped off epidermis are not dead. Mechanical virus transmission is generally possible

with virus from killed material. Therefore we assume that non-persistent viruses occur in two forms, viz., a "mechanically transmissible form" and an "aphid transmissible form" or more exactly the complete virus particle and the nucleic acid.

VIII. IS IT POSSIBLE TO IMPROVE VIRUS TRANSMISSION BY APHIDS FROM STRIPPED EPIDERMIS?

At first we tried the effect of different chemicals (table 38). Only impregnating the diseased broadbean leaves with KCN improved the transmission of the lupin mosaic virus by aphids out of the stripped epidermis. Also impregnating the leaves with a buffer solution of pH 6 or 7 improved transmission (tables 39 and 40). It is not likely that the effect produced by KCN has the same basis as that produced by certain hydrogen concentrations.

IX. DOES THE EXPLANATION OF THE EFFECT OF ULTRA-VIOLET IRRADIATION GIVE ANY INFORMATION ABOUT THE UPTAKE OF A NON-PERSISTENT VIRUS BY APHIDS OUT OF STRIPPED EPIDERMIS?

First we studied the effect of ultra-violet irradiation on leaves impregnated with KCN (table 41). KCN prevented to a great extent the effect of ultra-violet irradiation. But eight hours after impregnating infected leaves with KCN it was almost impossible to transmit any virus by mechanical means from these leaves to healthy test plants (table 42). From the literature it is known that KCN prevents normal respiration and as a result of other processes that finally will happen within the cell, products may be formed that inactivate the virus. On the other hand the effect of KCN on virus transmission by aphids is by no means as great as the effect on mechanical transmission (table 43).

The effect of irradiation with ultra-violet light may be explained in part by the formation of an inhibitor. This inhibitor is inactivated in a living cell under influence of visible light. An inhibitor is formed in healthy leaves, irradiated with ultra-violet light (table 44) as well as in irradiated water (table 45). However, irradiation with ultra-violet light does not inactivate all the virus in the epidermis as was supposed by BAWDEN *et al.* (1954), since the results of our experiments show that irradiation even immediately after inoculation does not prevent all infection (table 46). The experiments reproduced in table 47 show the inhibiting effect of irradiating the virus source with ultra-violet light on the results of mechanical virus transmission, and to a much higher degree on the transmission by aphids.

X. INFLUENCE OF BACKGROUND COLOUR ON THE SUCKING PROCESS OF THE APHID

In experiments with a high pressure cell described earlier (fig. 7) the aphids liked to probe on the brass part of the cell, and it was found that on the stripped epidermis the aphid probed much sooner when a leaf of *Kalanchoë blossfeldiana* or *Zygocactus truncatus* was used as background. Data on these facts are summarized in table 48. They are in agreement with the findings of MOERICKE (1951).

XI. CONCLUSION

We do not yet have a very clear of all factors affecting virus in the cell wall, such as its form, and its translocation from cell to cell. An inhibitor may be formed as a result of stripping off an epidermis from a leaf. The results of experiments carried out by BRADLEY (1956) may support this idea . He found that infected aphids tried to feed on a test plant through a membrane of parafilm or a stripped epidermis, few test plants were infected. But feeding through parafilm did not reduce their infectivity on a second test plant, as compared to infective aphids feeding immediately to such a test plant. However, if they had tried to feed through a stripped off epidermis of tulip and, were then placed on a test plant, their infectivity was reduced from 62% in controls to 15%. When such aphids feeding normally during 5 min. on such test plants gave 88% of infection, they still gave 63% on a second test plant (BRADLEY & RIDEOUT, 1953). Clearly the feeding through an epidermis in contrast to feeding through parafilm strongly reduced the infectivity of the aphid. This indeed suggest that the stripped off epidermis contained an inhibitor. Unfortunately BRADLEY seems not to have tried whether the transmission of his virus was reduced by feeding on intact tulip leaves.

LITERATUURLIJST

ADAMS, J. B. & J. W. MCALLAN, 1956. Pectinase in the saliva of Myzus persicae (Sulz.) (Homoptera: Aphididae). Can. J. Zool. 34: 541-543.

MCALLAN, J. W. & M. L. CAMERON, 1956. Determination of pectin polygalacturonase in four species of aphids. Can. J. Zool. 34: 559-564.

BAWDEN, F. C. & E. M. CROOK, 1947. Some properties of potato virus X in leaf extracts made in different ways. Brit. J. exp. Path. 28: 403-405.

BAWDEN, F. C., B. M. G. HAMLYN & M. A. WATSON, 1954. The distribution of viruses in different leaf tissues and its influence on virus-transmission by aphids. Ann. appl. Biol. 41: 229-239.

BAWDEN, F. C. & A. KLECZKOWSKI, 1953. The behaviour of some plant viruses after exposure to ultra-violet radiation. J. gen. Microbiol. 8: 145-156.

BAWDEN, F. C. & A. KLECZKOWSKI, 1955. Studies on the ability of light to counteract the inactivating action of ultra-violet radiation on plant viruses. J. gen. Microbiol. 13: 370-382.

BADWEN, F. C. & N. W. PIRIE,1938a. Liquid crystalline preparations of potato virus X. Brit. J. exp. Path. 19: 66-82.

BADWEN, F. C. & N. W. PIRIE, 1938b. Crystalline preparations of tomato bushy stunt virus. Brit. J. exp. Path. 19: 251-263.

BADWEN, F. C. & N. W. PIRIE, 1945. The separation and properties of tobacco mosaic in different states of aggregation. Brit. J. exp. Path. 26: 294-312.

BADWEN, F. C. & N. W. PIRIE, 1946. The virus content of plants suffering from tobacco mosaic. Brit. J. exp. Path. 27: 81-90.

BADWEN, F. C. & F. M. ROBERTS, 1947. The influence of light intensivity on the susceptibility of plants to certain viruses. Ann. appl. Biol. 34: 286-296.

BADWEN, F. C. & F. M. ROBERTS, 1948. Photosynthesis and predisposition of plants to infection with certain viruses. Ann. appl. Biol. 35: 418-428.

BEEMSTER, A. B. R., 1957. Investigations on a virus disease of turnip (Brassica rapa var. rapifera). Tijdschr. Pl. ziekten 63: 1-12.

BENDA, G. T. A., 1955. Some effects of ultra-violet radiation on leaves of French bean (Phaseolus vulgaris L.). Ann. appl. Biol. 43: 71-85.

BLACK, L. M., 1940. Mechanical transmission of aster-yellows virus to leafhoppers Abstr.). Phytopath. 30: 2-3.

BRADLEY, R. H. E., 1952. Studies on the aphid transmission of a strain of henbane mosaic virus. Ann. appl. Biol. 39: 78-97.
BRADLEY, R. H. E., 1953. Infectivity of aphids after several hours on tobacco infected with potato virus Y. Nature 171: 755.
BRADLEY, R. H. E., 1954. Ultra-violet irradiation of tobacco infected with potato virus Y and the availibility of virus to aphids. Nature 173: 350.
BRADLEY, R. H. E., 1956. Effect of depth of stylet penetration on aphid transmission of potato virus Y. Can. J. Microbiol. 2: 539-547.
BRADLEY, R. H. E. & R. Y. GANONG, 1955a. Evidence that potato virus Y is carried near the tip of the stylets of the aphid vector Myzus persicae (Sulz.). Can. J. Microbiol. 1: 775-782.
BRADLEY, R. H. E. & R. Y. GANONG, 1955b. Some effects of formaldehyde on potato virus Y in vitro, and ability of aphids to transmit the virus when their stylets are treated with formaldehyde. Can. J. Microbiol. 1: 783-793.
BRADLEY, R. H. E. & R. Y. GANONG, 1957. Three more viruses borne at the stylet tips of the aphid Myzus persicae (Sulz.). Can. J. Microbiol. 3: 669-670.
BRADLEY, R. H. E. & D. W. RIDEOUT, 1953. Comparative transmission of potato virus Y by four aphid species that infest potato. Can. J. Zool. 31: 333-341.
CURRIER, H. B. & W. VAN DER ZWEEP, 1955. Plasmolysis and the tetrazolium reaction in Anacharis canadensis. Protoplasma 45: 125-132.
DAY, M. F. & H. IRZYKIEWICZ, 1954. On the mechanism of transmission of non-persistent phytopathogenic viruses by aphids. Austr. J. biol. Sci. 7: 251-273.
ESAU, K., 1956. An anatomist's view of virus diseases. Am. J. Bot. 43: 739-748.
FRAENKEL-CONRAT, H. & R. C. WILLIAMS, 1955. Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components. Proc. Nat. Acad. Sci. 41: 690-698.
FREY-WYSSLING, A., 1950. Physiology of cell wall growth. Ann. Rev. Plant Physiol. 1: 169-182.
GIERER, A. & G. SCHRAMM, 1956. Die Infektiosität der Nucleinsaüre aus Tabakmosaikvirus. Z. Naturforschg. 11b: 138-142.
HAMILTON, M. A., 1935. Further experiments on the artificial feeding of Myzus persicae (Sulz.). Ann. appl. Biol. 22: 243-258.
HARRISON, B. D., 1957. Scot. hort. Res. Inst. Fourth ann. Rep. 1956-57: 30.
HART, R. G., 1955a. Electron-microscopic evidence for the localisation of ribonucleic acid in the particles of tobacco mosaic virus. Proc. Nat. Acad. Sci. 41: 261-264.
HART, R. G., 1955b. Infectivity measurements of partially degraded tobacco mosaic virus. Virology 1: 401-407.
HEINZE, K., 1955a. Versuche zur Uebertragung des Blattrollvirus der Kartoffel in den Uebertrager (Myzodes persicae Sulz.) mit Injektions Verfahren. Phytopath. Z. 25: 103-108.
HEINZE, K., 1955b. Survival of aphids after injection. J. Econ. Entomol. 48: 751.
HEINZE, K., 1957. Das pflanzliche Virus in Ueberträger und seine Einbringung in die Pflanze. Z. angew. Zool. 44: 187-227.
HERSHEY, A. D. & M. CHASE, 1952-1953. Independant functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. J. gen. Physiol. 36: 39-56.
HOGGAN, I. A., 1933. Some factors involved in aphid transmission of the cucumber-mosaic virus to tobacco. J. Agr. Res. 47: 689-704.
JEENER, R. & C. VAN RIJSSELBERGE, 1955. Un essai d'infection directe des cellules du parenchyme de la feuille du tabac à l'aide de virus de la mosaique marqué par le ^{14}C et le ^{32}P sort du virus. Biochem. Biophys. Acta 17: 233-239.
JOHNSON, B., 1956. Function of the antennae of aphids during flights. Australian J. Sci. 18: 199-200.
KASSANIS, B., 1939. Intranuclear inclusions in virus infected plants. Ann. appl. Biol. 26: 705-709.
KENNEDY, J. S., 1951. Host plant selection in aphididae. Trans. IX Int. Congr. Entomol. Amsterdam 2: 106-113.
KENNEDY, J. S. & T. E. MITTLER, 1953. A method of obtaining phloëm sap via the mouth-parts of aphids. Nature 171: 528.
KLECZKOWSKI, A., 1949. The tranformation of local lesion counts for statistical analysis. Ann. appl. Biol. 36: 139-152.
LAMBERTZ, P., 1954. Untersuchungen über das Vorkommen von Plasmodesmen in den Epidermisauszenwänden. Planta 44: 147-190.

LEBEN, C. & R. W. FULTON, 1952. Effect of certain antibiotics on lesion production by two plant viruses. Phytopath. 42: 331-335.
MARKHAM, R. & KENNETH M. SMITH, 1949. Studies on the virus of turnip yellow mosaic. Parasitology 39: 330-342.
MARKHAM, R., R. E. F. MATTHEWS & K. M. SMITH, 1948. Specific crystalline protein and nucleoprotein from a plant virus having insect vectors. Nature 162: 88.
MASTENBROEK, C., 1942. Enkele veldwaarnemingen over virusziekten van lupine en een onderzoek over haar mozaïekziekte. Tijdschr. Pl.ziekten 48: 97-118.
MEEUSE, A. D. J., 1941. Plasmodosmata. Bot. Rev. 7: 249-262.
MITTLER, T. E., 1953. Amino-Acids in phloem sap and their excretion by aphids. Nature 172: 207.
MOERICKE, V., 1950. Ueber das Farbsehen der Pfirsichblattlaus (Myzodes persicae Sulz.) Tierpsychol. 7: 265-274.
MOERICKE, V., 1951. Eine Farbfalle zur Kontrolle des Fluges von Blattläusen, insbesondere der Pfirsichblattlaus Myzodes persicae Sulz. Nachr. Bl.dtsch. Pflanzenschutd. 3: 23-24.
NICOLAI, M. F. E., 1929. Over de veranderingen van de permeabiliteit in wortelcellen. Diss. Leiden.
OVEREND, W. G. & A. R. PEACOCKE, 1957. The molecular basis of heredity. Endeavour 16: 90-99.
ROELOFSEN, P. A. & A. L. HOUWINK, 1951. Cell wall structure of staminal hairs of Tradescantia virginica and its relation with growth. Protoplasma 40: 1-22.
SCHUMACHER, W. & P. LAMBERTZ, 1956. Ueber die Beziehungen zwischen der Stoffaufnahme durch Blattepidermen und der Zahl der Plasmodesmen in den Aussenwänden. Planta 47: 47-52.
SCHUSTER, H., G. SCHRAMM & W. ZILLIG, 1956. Die Struktur der Ribonucleinsaüre aus Tabakmosaikvirus. Z. Naturforschg. 11b: 339-345.
SHEFFIELD, F. M. L., 1936. The roll of plasmodesms in the translocation of virus. Ann. appl. Biol. 23: 506-508.
SIEGEL, A. & S. G. WILDMAN, 1956. The inactivation of the infectious centres of tobacco mosaic virus by ultra-violet light. Virology 2: 69-82.
SKOTLAND, C. B. & D. J. HAGEDORN, 1955. Vector-feeding and plant-tissue relation ships in the transmission of the wisconsin pea streak virus. Phytopath. 45: 665-666.
SOEST, W. VAN, 1955. Een instrument voor het afsnijden van de stiletten bij zuigende bladluizen. Tijdschr. Pl.ziekten 61: 60-61.
SOEST, W. VAN & V. DE MEESTER-MANGER CATS, 1956. Does the aphid Myzus persicae (Sulz.) imbibe tobacco mosaic virus? Virology 2: 411-414.
STEGWEE, D., 1957. Virus-vector relationship in potato leaf roll transmission. Lecture held on the meeting of Soc. exp. Biol. Cambridge, April 1957.
STOMPS, TH. J., 1943. Cytologie. Leerboek der algemene plantkunde, deel I onder redactie van Prof. Dr. V. J. Koningsberger.
STRASBURGER, E., 1901. Ueber Plasmaverbindungen Pflanzlicher Zellen. Jb. Wiss. Bot. 36: 493-601.
STRASBURGER, E., & M. KOERNICKE, 1923. Das botanische Praktikum, 586-687.
SUKHOV, K. S., 1944. Salivary secretion of the aphid Myzus persicae (Sulz.) and its ability to form a filtering aparatus. C.R. Acad. Sci. U.R.S.S. Nouv. Ser. 42: 226-228.
SYLVESTER, E. S., 1954. Aphid transmission of non persistent plant viruses with special reference to the brassica nigra virus. Hilgardia 23: 53-98.
VENEKAMP, J. H., 1955. The metabolism of amides and amino acids in etiolated seedlings of Lupinus luteus L. Diss. G.U. Amsterdam.
WANT, J. P. H. VAN DER, 1954. Onderzoekingen over virusziekten van de boon (Phaseolus vulgaris L.). Diss. Wageningen.
WATSON, M. A. & F. M. ROBERTS, 1940. Evidence against the hypothesis that certain plant viruses are transmitted mechanically by aphids. Ann. appl. Biol. 27: 227-233.
WEBER, H., 1928. Skelett, Muskulatur und Darm der schwarzen Blattlaus, Aphis fabae Scop. Zoölogica 28, Heft 76.
YARWOOD, C. E., 1953. Pressure effects in fungus and virus infections. Phyhopath. 43: 70-72.
ZWEIGELT, F., 1915. Beiträge zur Kenntnis des Saugphänomens der Blattläuse und der Reaktionen der Pflanzenzellen. Cbl. Bakteriol. Parasietenk. Infectionskrankh. 42: 265-335.

FOTO'S

PHOTOGRAPHS

Foto 1
Photograph 1

Foto 2
Photograph 2

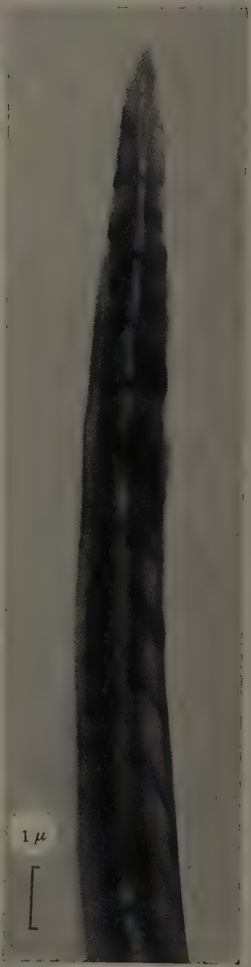


Foto 3
Photograph 3

Elektronenmicroscopische opnamen van de punt van de mandibulaire stilet van *Myzus persicae* Sulz.
In de foto's 2 en 3 vertoont het centrale kanaal in de mandibulaire stilet onderbrekingen en is het bovendien vertakt.

Electronmicrographs of the tip of the mandibulary stylet of Myzus persicae Sulz.
In the photographs 2 and 3 the central canal in the mandibulary stylet is not only interrupted, but also branched.

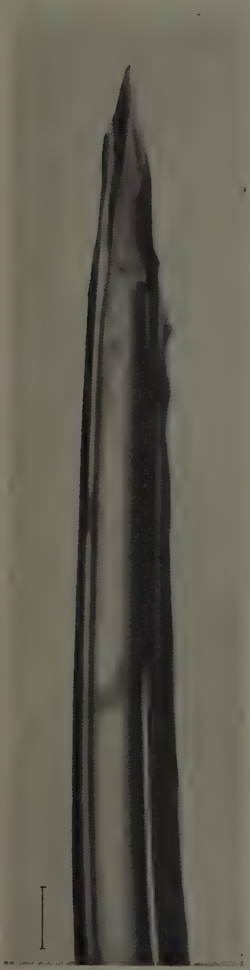


Foto 4
Photograph 4

Foto 5
Photograph 5

Foto 6
Photograph 6

Foto 4 en 5
Elektronenmicroscopische opnamen van de punt van de twee maxillaire stiletten van *Myzus persicae* Sulz.
Electronmicrographs of the apices of both the maxillary stylets of Myzus persicae Sulz.

Foto 6
Elektronenmicroscopische opname van de punten van een paar maxillaire stiletten van *Myzus persicae* Sulz. Hierbij valt op, dat de beide punten geen gesloten oog vormen.
Electronmicrograph of the apices of the maxillary stylets of Myzus persicae Sulz. Note that the apices do not form a closed needle's eye.

Foto 7
Photograph 7

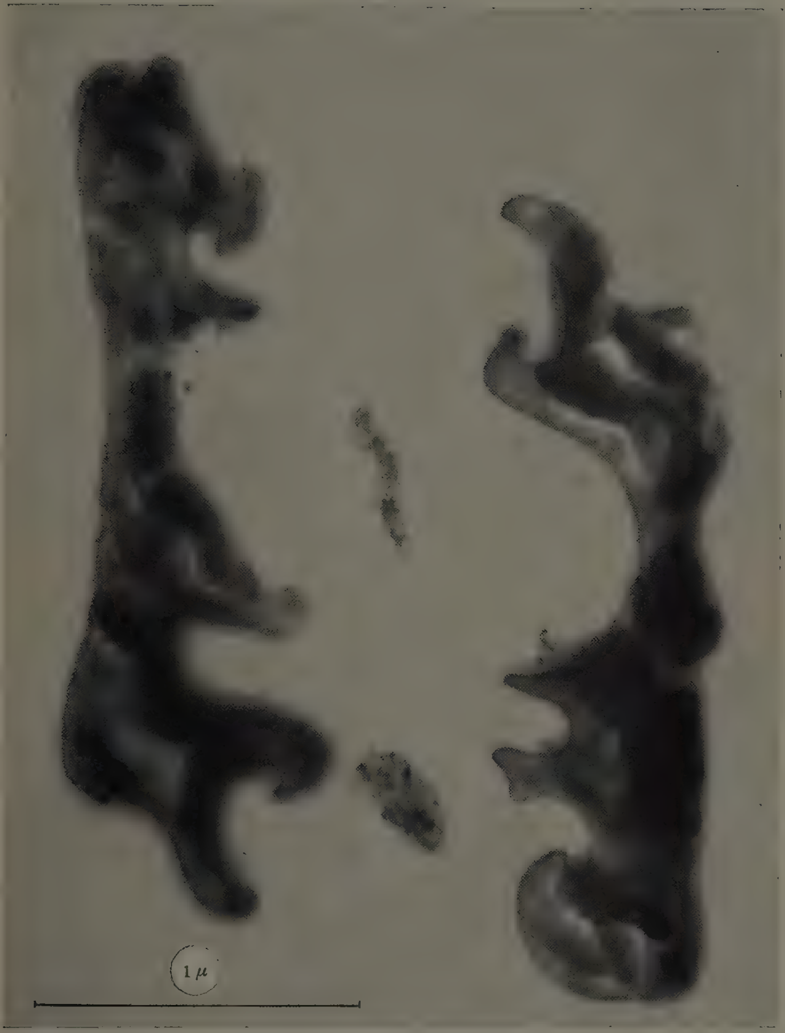


Foto 8
Photograph 8

Foto 7
Elektronenmicroscopische opname van een coupe gemaakt met het ultramicrotoom van de vier stiletten van *Myzus persicae* Sulz.
Electronmicrograph of an ultramicrotome section of the four stylets of Myzus persicae Sulz.

Foto 8
Elektronenmicroscopische opname van een coupe gemaakt met het ultramicrotoom van de maxillaire stiletten van *Myzus persicae* Sulz.
Electronmicrograph of an ultramicrotome section of the maxillary stylets of Myzus persicae Sulz.

Foto 9
Photograph 9

Afdruk van de punt van het labium van *Myzus persicae* Sulz. op de cuticula van tuinboon.
Imprint of the tip of the labium of Myzus persicae Sulz. on the cuticle of broadbean.

Foto 10
Photograph 10

Afdruk van de punt van het labium van *Aphis fabae* Scop. op de cuticula van hyacint.
Imprint of the tip of the labium of Aphis fabae Scop. on the cuticle of hyacinth.

Foto 11
Photograph 11

Elektronenmicroscopische opname van een speekselschede van *Aphis fabae* Scop., die gedeeltelijk in de celwand en gedeeltelijk in een vrije ruimte gevormd is.
In dit laatste geval is de schede niet regelmatig, doch onregelmatig gevormd.
Electronmicrograph of the salivary sheath of Aphis fabae Scop. The sheath is partly formed in the cell wall, and partly in a free space. In the latter case the sheath is not regular, but irregular in outline.

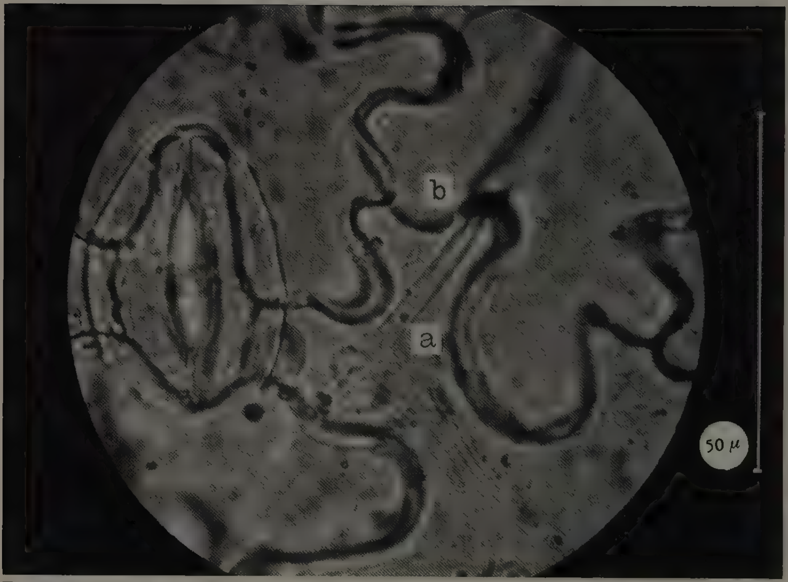


Foto 12
Photograph 12

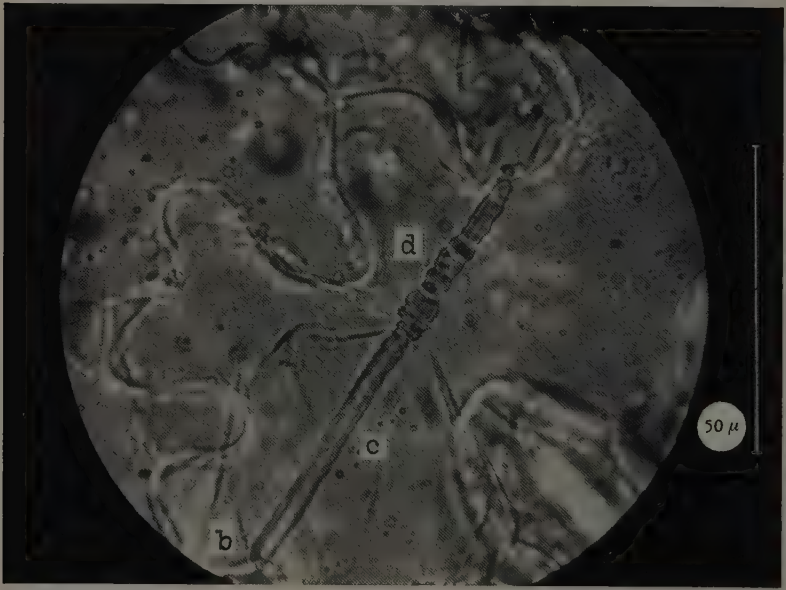


Foto 13
Photograph 13

Foto 14
Photograph 14

Foto 12, 13 en 14
Speekselschede achtereenvolgens in de buitencelwand (a in foto 12), in de dwarse celwand (b) en de celwand evenwijdig aan de cuticula (c), waarna de speekselschede in de vloeistof gevormd wordt (d), nadat ze door de stukgetrokken wand van een sponsparenchymcel de celwand verlaten heeft (foto 13).
Foto 14 geeft een overzicht van het verloop van de hele speekselschede van *Myzus persicae* Sulz. in de epidermis van tuinboon.

Salivary sheath formed in the outer cell wall (a in photograph 12), in the transverse cell wall (b) and in the cell wall parallel to the cuticle (c). The salivary sheath is formed in water after emerging from the torn cell wall of the spongy parenchyma cell (d).
Photograph 14 gives a general picture of the same salivary sheath of Myzus persicae Sulz. in the epidermis of broadbean.

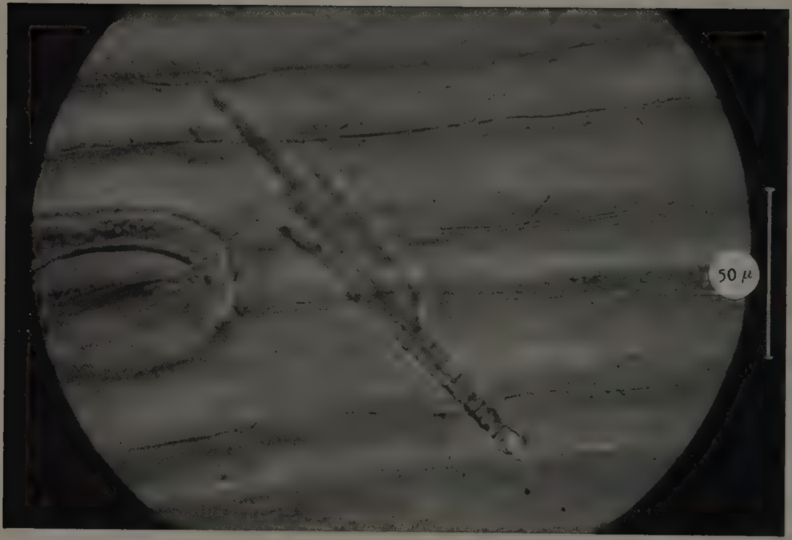


Foto 15
Photograph 15

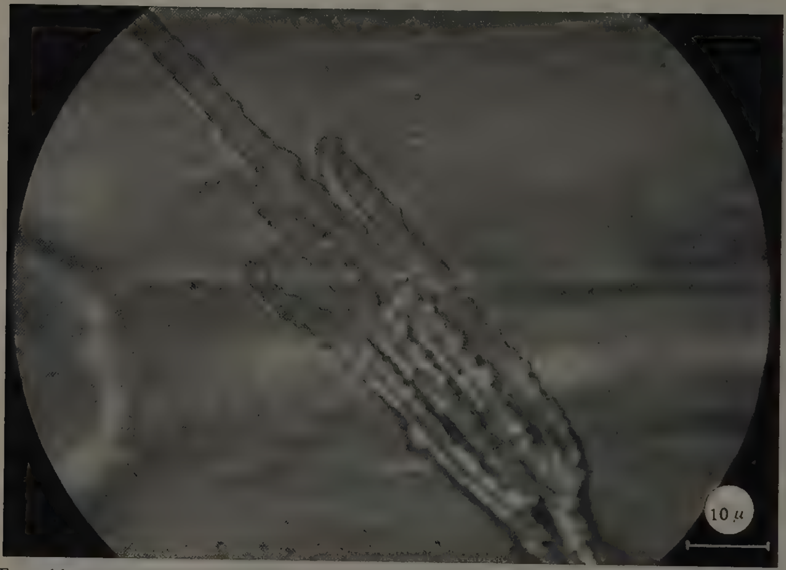


Foto 16
Photograph 16

Foto 15 en 16
Dezelfde speekselschede van *Aphis fabae* Scop. gevormd in de vloeistof boven de afgetrokken epidermis van hyacint.
The same salivary sheath of Aphis fabae Scop. formed in the liquid above the stripped epidermis of hyacinth.

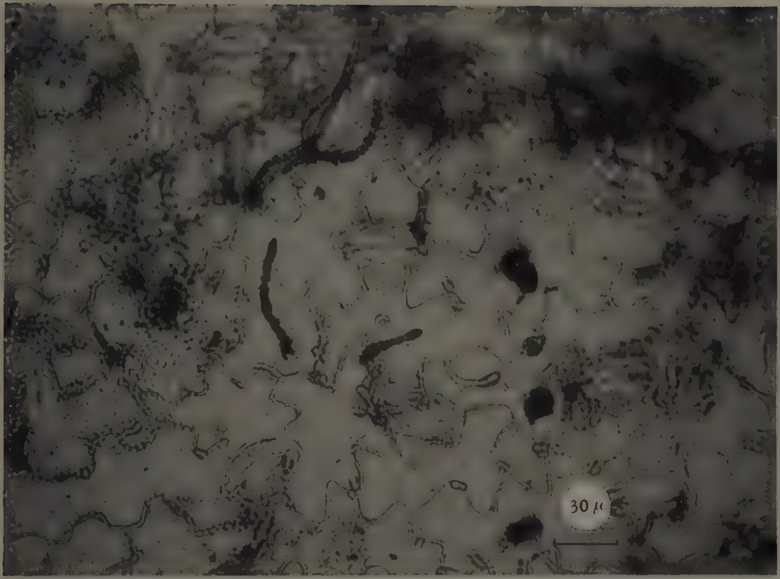


Foto 17
Photograph 17

Epidermis afgetrokken van blad van tuinboon, waarop veel zwarte boneluizen (*Aphis fabae* Scop.) hebben gezogen. De speekselscheden, die in de intercellulaire ruimten van het sponsparenchym gevormd zijn, zijn met katoenblauw-lactophenol blauw gekleurd en steken als schoorstenen uit de dwarse celwanden.

Epidermis stripped off leaf of broadbean on which many Aphis fabae Scop. had fed. The salivary sheaths, formed in the sprongy parenchyma in the intercellular spaces, are stained with cottonblue-lactophenol. They protrude like chimneys from the transverse cell walls of the epidermis.

Foto 18
Photograph 18

Foto 19
Photograph 19

Foto 18 en 19
Elektronenmicroscopische opnamen van positief replica's van de verwonding van de tuinboonepidermis van een blad van tuinboon, veroorzaakt door wrijven met carborundum van 500 mesh.

Electronmicrographs of positive replicas of the wound formed on the outer cell wall of a broadbean leaf as a result of rubbing with carborundum of 500 mesh.

Mededelingen van het Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek
Contributions of the Institute for Phytopathological Research

Binnenhaven 4a, Wageningen, The Netherlands

No 137. KLINKENBERG, C. H. en J. W. SEINHORST, De nematicide werking van Na N-methyl dithiocarbaminaat (Vapam) bij toepassing in de herfst. (The nematicidal properties of Na N-methyl-dithiocarbamate (Vapam) when applied in autumn). Meded. L.H.S. Gent, XXI: 397–400, 1956. Prijs no 137 en 138 samen f 0,40.

No 138. SEINHORST, J. W., J. D. BIJLOO en C. H. KLINKENBERG, Een vergelijking van de nematicide werking van DD en van 3-5-dimethyltetrahydro-1-3-5-2H-thiadiazine-2-thion. (A comparison of the nematicidal properties of DD and of 3-5-dimethyltetrahydro-1-3-5-2H-thiadiazine-2-thione). Meded. L.H.S. Gent, XXI: 387–395, 1956. Prijs no 137 en 138 samen f 0,40.

No 139. HOOF, H. A. VAN en SJ. TOLSMA, Virusziekte bij rabarber. (Virus disease of rhubarb). Meded. Dir. Tuinb., 19: 761–764, 1956. Prijs no 139 en 140 samen f 0,60.

No 140. HOOF, H. A. VAN, Verschil in reactie van wilde sla ten opzichte van besmetting met het slamozaiekvirus. (Differences in reaction of wild lettuces with regard to infection by Lactuca virus 1). Tijdschr. o. Plantenz., 62: 285–290, 1956. Prijs no 139 en 140 samen f 0,60.

No 141. BEEMSTER, A. B. R., Onderzoekingen over een virusziekte bij stoppelknollen (Brassica rapa var. rapifera). (Investigations on a virus disease of turnip). Tijdschr. o. Plantenz., 63: 1–12, 1957. Prijs f 0,40.

No 142. FRANSSEN, C. J. H., De levenswijze en de bestrijding van de tuinboonkever. (The biology and control of Bruchus rufimanus Boh.). Versl. Landbouwk. Onderz., No. 62. 10, 75 pp., 1956. Prijs f 2,75.

No 143. FRANSSEN, C. J. H., De levenswijze en de bestrijding van de bonekever (Acanthoscelides obtectus Say). (Biology and control of the common bean weevil). Meded. Dir. Tuinb., 19: 797–809, 1956. Prijs f 0,55.

No 144. NIJVELDT, W. C., Levenswijze en bestrijding van de aspergevlieg. (Platyparea poeciloptera Schrank) in Nederland. (Biology and control of Platyparea poeciloptera Schrank in the Netherlands). Versl. Landbouwk. Onderz., No 63. 4, 40 pp., 1956. Prijs f 1,65.

No 145. VAUGHAN, EDWARD K., A device for the rapid removal of tannins from virus infected plant tissues before extraction of inoculum. Tijdschr. o. Plantenz., 266–270, 1956. Prijs no 145 en 146 samen f 0,30.

No 146. VAUGHAN, EDWARD K., Attempts to transfer Rubus and Fragaria viruses into herbaceous hosts. Tijdschr. o. Plantenz., 62: 271–273, 1956. Prijs no 145 en 146 samen f 0,30.

No 147. ZEYLSTRA, H. H., Papierchromatografie als middel voor de diagnose van de ringvlekkenziekte van zoete kers. Een voorlopige mededeling. (Paper chromatography and diagnosis of ring spot disease in sweet cherry. A preliminary report). Tijdschr. o. Plantenz., 62: 325–326, 1956. Prijs no 147 en 148 samen f 0,25.

No 148. QUAK, FRED.a., Meristeemcultuur, gecombineerd met warmtebehandeling, voor het verkrijgen van virusvrije anjerplanten. (Meristem culture, combined with heat treatment, inorder to obtain virus-free carnation plants). Tijdschr. o. Plantenz., 63: 13–14, 1957. Prijs no 147 en 148 samen f 0,25.

No 149. FRANSEN, J. J., De landbouwluchtvaart in Nederland. (Agricultural aviation in the Netherlands). Landbouwvoorl., 13: 578-585, 1956. f 0,45.

No 150. HUBBELING, N., New aspects of breeding for disease resistance in beans. Euphytica, 6: 111–141, 1957. Prijs no 150 f 3,–.

No 151. QUAK. FRED.a, Bladvlekkenziekte bij spruitkool veroorzaakt door ¡Mycosphaerella brassicicola (Fr.) Lindau. (Ringspot disease of brussels sprouts caused by Mycosphaerella brassicicola (Fr.) Lindau) Meded. Dir. Tuinb., 20: 317–320, 1957. Prijs no 151, 152 en 153 samen f 0,95.

No 152. LABRUYÈRE, R. E., Enkele waarnemingen over de schimmel Elsinoë veneta (Burkh.) Jenk., de perfecte vorm van Sphaceloma necator (Ell. et Ev.) Jenk. en Shear. (Observations on Elsinoë veneta (Burkh.) the perfect form of Sphaceloma necator (Ell. et Ev.) on raspberry) Tijdschr. o. Plantenz., 63: 153–158, 1957. Prijs no 151, 152 en 153 samen f 0,95.

No 153. NOORDAM, D., G. P. TERMOHLEN en T. H. THUNG, Kurkwortelverschijnselen van tomaat, veroorzaakt door een steriel mycelium. (Corky root symptoms of tomato caused by a sterile mycelium) Tijdschr. o. Plantez., 63: 145–152, 1957. Prijs no 151, 152 en 153 samen f 0,95.

No 154. NIJVELDT, W., Aphid-eating gall midges (Cecidomyidae), with special reference to those in the Barnes collection. Entomol. Ber., 17:233-239, 1957. Prijs no 154 en 155 samen f 0.30.

No 155. NIJVELDT, W., Nieuwe galmuggen voor de Nederlandse fauna (I). Gall midges new for the fauna of the Netherlands). Entomol. Ber., 17:77-78, 1957. No 154 en 155 samen f 0.30.

No 156. HOOF, H. A. VAN, On the mechanism of transmission of some plant viruses. Proc. kon. akad. wet. ser. C, 60:314-317, 1957. Prijs no 156 f 0.30.

No 157. NOORDAM, D., Tabaksnecrosevirus in samenhang met een oppervlakkige aantasting van aardappelknollen. (Tobacco necrosis virus associated with a superficial affection of potato tubers) Tijdschr. o. Plantez., 63:237-241, 1957. Prijs f 0.35.

No 158. BOS, L., Plant teratology and plant pathology. (Plantenteratologie en planteziektenkunde) Tijdschr. o. Plantez., 63:222-231, 1957. Prijs f 0.45.

No 159. VRIE, M. VAN DE, Waarnemingen over de biologie en bestrijding van de aardbeimijt (Tarsonemus pallidus Banks) in productievelden. (Observations on the biology and control of the strawberry crown mite (Tarsonemus pallidus Banks) in production fields) Meded. Landbouwhogesch. Gent, 22:471-480, 1957. Prijs f 0.60.

No 160. EVENHUIS, H. H., Een oecologisch onderzoek over de appelbloedluis (Eriosoma lanigerum (Hausm.), en haar parasiet Aphelinus mali (Hald.) in Nederland. (Ecological investigations on the woolly aphid, Eriosoma lanigerum (Hausm.), and its parasite Aphelinus mali (Hald.) in the Netherlands) Tijdschr. o. Plantez., 64: 1-103, 1958. Prijs f 3.45.

No 161. HOOF, H. A. VAN, Onderzoekingen over de biologische overdracht van een non-persistent virus. (An investigation of the biological transmission of a non-persistent virus) Dissertatie Wageningen, 1958, 98 pp. Prijs f 4.35.